

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Étude de la fonction de TMEM45A dans l'épiderme humain normal et pathologique

Goulard, Michaël

Award date:
2016

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**ETUDE DE LA FONCTION DE TMEM45A DANS L'EPIDERME HUMAIN NORMAL
ET PATHOLOGIQUE**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Michaël GOULARD

Janvier 2016

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

Etude de la fonction de TMEM45A dans l'épiderme humain normal et pathologique

GOULARD Michaël

Résumé

Récemment, il a été montré que l'expression de TMEM45A est corrélée à la kératinisation épidermique, mais la fonction de ce gène reste inconnue.

Ce mémoire se divise en deux parties : le développement et la mise au point d'outils permettant d'analyser l'exocytose des kératinocytes dans le but d'étudier un rôle éventuel de TMEM45A dans l'exocytose des kératinocytes, et l'étude de l'expression et de la régulation éventuelle de l'expression de TMEM45B, un autre membre de la famille TMEM45. Des cultures confluentes de kératinocytes ainsi que des épidermes humains reconstruits sont utilisés comme modèles.

Lors de la première partie, consacrée à la mise au point d'outils permettant d'analyser l'exocytose des kératinocytes, nous avons utilisé l'ionomycine, un ionophore sélectif, afin d'induire l'exocytose. L'exocytose d'ATP a également été analysée. Des détectations immunofluorescentes de LAMP1, une protéine membranaire associée aux lysosomes, ont été réalisées afin d'analyser la potentielle redistribution de LAMP1 concomitante avec l'exocytose.

Etant donné que l'invalidation de TMEM45A ne donne aucun phénotype apparent et n'empêche pas l'épiderme de se former normalement, il a été supposé que l'invalidation de TMEM45A peut être compensée par TMEM45B. La deuxième partie de ce mémoire est consacrée à l'étude de l'expression et de la régulation éventuelle de l'expression de TMEM45B. Nous avons réalisé une analyse de l'expression des ARN messagers de TMEM45B par PCR quantitative après transcription reverse. Nous avons également réalisé des détectations immunofluorescentes de la protéine codée par TMEM45B, la protéine transmembranaire 45B. Finalement, nous avons réalisé une analyse de l'expression de la protéine par Western Blot. Ces données ne sont pas encore complètes et nécessitent encore de nombreuses mises au point.

Nous n'avons pas réussi à mettre au point entièrement les outils permettant d'analyser le rôle de TMEM45A dans l'exocytose, ni de caractériser parfaitement l'expression de TMEM45B, mais ces recherches nécessitent encore des mises au points et soulèvent également de nombreuses interrogations.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2016

Promoteur: Y. Poumay

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement mon promoteur, le Prof. Yves Poumay, de m'avoir accueilli chaleureusement au sein de son équipe. Je le remercie pour son écoute, sa disponibilité, ses conseils, son suivi et sa motivation. Je le remercie également pour sa rigueur scientifique, et de m'avoir permis d'apprendre. J'ai appris énormément de choses et je lui en suis très reconnaissant.

Je remercie également ma doctorante, Aurélie, pour mon entrée au sein du pays merveilleux de TMEM45A. Un grand merci pour tes nombreuses relectures, tes petits conseils et ta rigueur frôlant la perfection. Merci pour tes conseils sur les manips, et au plaisir autour d'un petit SmallWorld ☺

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide de cette merveilleuse équipe et ce merveilleux labo qu'est le LabCeTi. Je pense que je n'aurais pas pu trouver meilleure ambiance. Ce fût vraiment un plaisir de passer un an avec toute cette équipe...Bien plus que des collègues, ce sont des amis.

Je remercie particulièrement Valérie et Benoit pour leur aide. Merci à vous deux de m'avoir appris toutes ces choses, merci de m'avoir donné goût à la culture cellulaire, aux (nombreux) marquages, à la recherche. J'ai énormément appris grâce à vous, et je vous en suis très reconnaissant. Merci également à Catherine pour les conseils scientifiques et les nombreuses relectures de l'article mais également de ce mémoire.

Ensuite, merci à mes co-mémos : Nico, Gwen et Momo. Cette année n'aurait pas été la même sans vous. C'est un réel plaisir de se lever en se disant qu'on va passer une excellente journée à vos côtés : Nico, ces heures de musique au « bureau » nous motivant à se battre pour la Terre du Milieu ; Gwen et tes merveilleux cupcakes, en espérant que tu arrêtes de te planter partout où tu passes ☺ ; Maureen et tes jeux de mots involontaires. J'ai appris à vous connaître encore mieux à force de devoir vous supporter et ce fût très agréable !

Evidemment, merci à tout le reste de l'équipe du 5^e étage : Jojo pour ces délires, ta bonne humeur, tes conseils (Joanna Bouchat lalalalalala 🎵), Céline pour tes conseils également, Evelyne pour ton sourire au quotidien et ton aide pour les stats (on t'offrira un pompier, promis !), Abdallah pour ta connaissance et tes nombreux conseils (#jaimepaslesréunions), Kat la maman du labo, Emilie, Patrick pour l'informatique, Benoit pour ces conseils cette aide au microscope, Jérémy pour la rigueur dont tu fais preuve et ton aide sur les stats et la mise en page, et Valérie pour les nombreux conseils sur la culture cellulaire et les nombreuses mises au point. Merci également à Daniel et à Mr Nicaise.

Je tiens également à remercier les personnes des autres laboratoires qui m'ont aidé et orienté dans les méandres de TMEM45A : Isabelle Hamer pour les connaissances sur LAMP1, Noëlle Ninane pour les photos au microscope confocal et les conseils sur les anticorps.

Finalement, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont rendu ceci possible, de près ou de loin, ainsi que ma famille qui m'a soutenu jusqu'à la dernière minute.

Table des matières

I. Remerciements	1
II. Tables des matières	2
III. Liste des abréviations	4
IV. Introduction	5
1. La peau	6
A. L'hypoderme	6
B. Le derme	6
C. L'épiderme	
a. La couche basale	7
b. La couche épineuse	7
c. La couche granuleuse	7
d. La couche cornée	8
e. La kératinisation	8
f. Autres types cellulaires présent dans l'épiderme	9
D. Régulation de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes	10
a. Facteurs de croissance	10
b. Cytokines et rétinoïdes	10
c. Calcium	11
2. Transport vésiculaire intracellulaire	11
3. Exocytose d'ATP vésiculaire	11
4. Relocalisation de LAMP1	12
5. Réponse immunitaire des kératinocytes	13
6. TMEM45A	13
A. Caractéristiques du gène	13
B. Implications dans le cancer et la chimiorésistance	14
C. Localisation de la protéine transmembranaire 45A dans la peau et rôle dans le trafic intracellulaire	14
D. TMEM45A chez la souris	15
7. Famille TMEM45	15
8. TMEM45B	15
A. Caractéristiques	15
B. Arguments en faveur de l'étude de TMEM45B	16
9. Objectifs du mémoire	16
V. Matériels et méthodes	18
1. Culture de kératinocytes épidermiques humains normaux	19
A. Isolement des kératinocytes et culture primaire	19
B. Culture secondaire	20
C. Culture tertiaire	20
D. Culture d'épidermes humains reconstruits	21
2. Test MTT	21
3. Incubation à l'ionomycine	21
4. Incubation avec la méthyl- β -cyclodextrine	22
5. Visualisation des vésicules d'ATP par la quinacrine	22

6. Dosage de l'ATP extracellulaire	22
7. ELISA	22
8. Analyse histologique	23
A. Coupe en paraffine	23
B. Coupe à congélation	23
9. Analyse de l'expression génique	24
A. Extraction de l'ARN total et dosage	24
B. Transcription reverse	24
C. Real-time PCR	24
10. Analyse de l'expression protéique	25
A. Extraction des protéines	25
B. Dosages des protéines	25
C. Electrophorèse, Western blotting et révélation	26
11. Marquages immunofluorescents	27
VI. Résultats	29
1. Première partie : rôle potentiel de TMEM45A dans l'exocytose	30
A. Toxicité de l'ionomycine	30
B. Redistribution de LAMP1 en surface	31
C. Exocytose d'ATP	32
a. Visualisation des vésicules d'ATP	32
b. Mesure de l'ATP extracellulaire	32
D. Réponse inflammatoire	33
2. Deuxième partie : TMEM45B	34
A. Analyse de l'expression des ARN messagers	34
B. Analyse de l'expression des protéines	35
a. Protéine transmembranaire 45B	35
b. Protéine transmembranaire 45A	35
C. Marquage & localisation	37
a. Peau normale et épidermes humains reconstruits	37
b. Culture de kératinocytes	38
VII. Discussions & perspectives	41
1. Première partie : rôle potentiel de TMEM45A dans l'exocytose	42
A. Toxicité de l'ionomycine	42
B. Analyse de la redistribution de LAMP1 en surface	42
C. Exocytose d'ATP	43
D. Réponse inflammatoire	44
E. Autres perspectives	45
2. Deuxième partie : TMEM45B	46
A. Analyse de l'expression des ARN messagers	46
B. Analyse de l'expression des protéines	47
C. Analyse de la localisation de la protéine transmembranaire 45B	49
3. Conclusions générales et perspectives	50
VIII. Bibliographie	51

Liste des abréviations

ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
C	Confluence
Ca ²⁺	Ions Ca ²⁺ , ions calcium
CGN	Cis-golgi network, réseau cis-golgien
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EEA1	Early endosome antigen 1
EGF	Facteur de croissance épidermique
FLG	Filaggrine
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HIF	Hypoxia inducible factor
IL	Interleukine
SG-SC transition	Transition de la couche granuleuse à la couche cornée
KGF	Keratinocyte growth factor
LAMP1	Lysosome-associated membrane protein 1
RPL13a	Ribosomal protein L13a
RPLP0	Ribosomal protein large P0
shRNA	Short hairpin RNA
SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SPRs, Small-Proline rich proteins	Petites protéines riches en proline
TBP	TATA-binding protein
TEDDM1	Protéine transmembranaire épididymale 1
TGF	Transforming growth factor
TGN	Trans-golgi network, réseau trans-golgien
TNF	Tumor necrosis factor
VNUT	Vesicular nucleotide transporter
VPS26	Vacuolar protein sorting-associated protein 26

Introduction

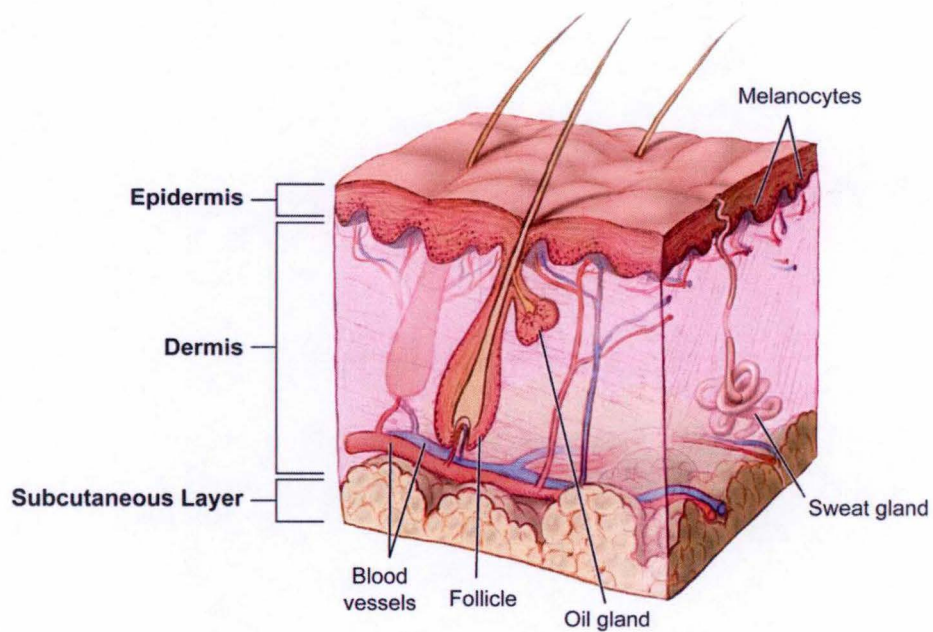


Figure 1 : Structure de la peau

L'épiderme est constitué de trois couches : l'hypoderme, le derme et l'épiderme.

(<http://www.history.navy.mil/museums/keyport/SkinThey'reIn/Photos/skindiagram.JPG>)

Introduction

1. La peau

La peau est un organe important du corps humain et remplit de majeures fonctions. C'est pourquoi un dysfonctionnement dans sa structure ou dans sa fonction peut avoir de majeures conséquences.

La peau est un organe complexe composé de plusieurs couches et types cellulaires. Des variations de la structure de la peau peuvent être observés en fonction de la région du corps observée : une peau abdominale ne sera pas la même qu'une peau palmaire. Ces variations peuvent donc s'observer en termes d'épaisseur, de composition mais également d'un point de vue métabolique. La peau est impliquée dans plusieurs mécanismes, notamment la protection contre les agents extérieurs, la thermorégulation, la perception, mais également la sécrétion. Elle est composée de trois couches : l'hypoderme, le derme et l'épiderme (**Fig 1**) [1-3].

A. L'hypoderme

L'hypoderme est la couche profonde de la peau et est un tissu de soutien. Le tissu hypodermique n'est pas fibreux mais plutôt riche en cellules. Il est constitué principalement d'adipocytes. Il a pour rôle le stockage d'énergie ainsi qu'une protection thermique et mécanique [1].

B. Le derme

Le derme est le tissu intermédiaire de la peau lui donnant une certaine élasticité et capacité de résistance à la traction. Le derme peut être séparé en deux régions : un derme réticulaire profond et un derme papillaire superficiel. Cette distinction est faite par leurs différences en termes de densité cellulaire, l'organisation tissulaire mais également d'innervation et de vascularisation. Le derme interagit avec l'épiderme grâce à la jonction épidermo-dermique qui permet à l'épiderme d'avoir un soutien mécanique mais également des échanges entre derme et épiderme.

Le collagène est le constituant principal du derme tandis que les fibres élastiques forment un réseau de la jonction épidermo-dermique à l'hypoderme. Des cellules sont également présentes dans le derme et sont responsables de la synthèse des protéines matricielles et d'autres facteurs : les fibroblastes. D'autres types cellulaires sont également présents tels que les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques dermiques [1].

C. L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau. C'est un épithélium stratifié, continuellement en renouvellement et dont les cellules démontrent un processus de différenciation progressive et terminale de la couche basale vers les couches les plus superficielles de l'épiderme. Une certaine homéostasie se met en place et permet de maintenir une balance continue entre renouvellement cellulaire (la prolifération) et la mort cellulaire des kératinocytes au niveau de la couche cornée (la cornification et la desquamation). Cette balance est finement régulée par plusieurs mécanismes et l'homéostasie de l'épiderme est régulée également par l'interaction des kératinocytes entre eux, avec les autres types cellulaires de l'épiderme, la lame basale mais également avec le derme sous-jacent [1].

Celui-ci est constitué de plusieurs types cellulaires : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel. La forme cellulaire majoritaire de l'épiderme est le kératinocyte, il constitue approximativement 95% des cellules de l'épiderme. La structure d'un kératinocyte peut facilement être corrélée à son état de différenciation au niveau de l'épiderme mais tous les kératinocytes contiennent des filaments intermédiaires de kératine. La kératine est importante pour une cellule épithéliale et a un rôle structural important [1].

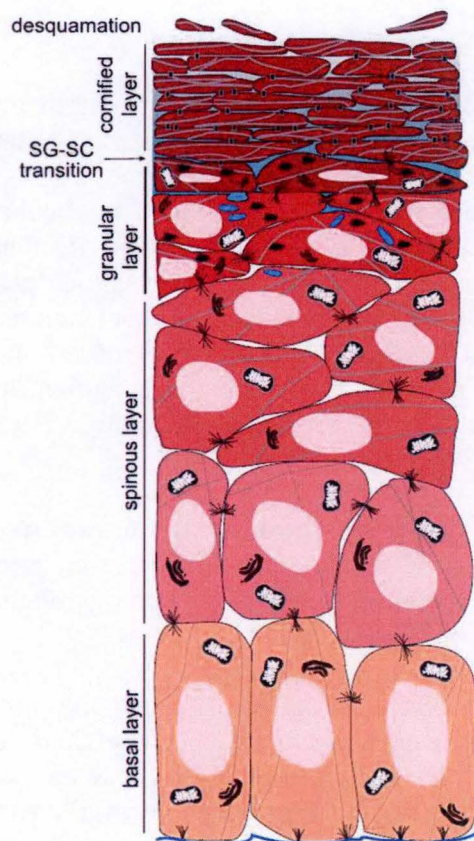


Figure 2 : Structure de l'épiderme

L'épiderme est constitué de 4 couches : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée. Modifié à partir de [4].

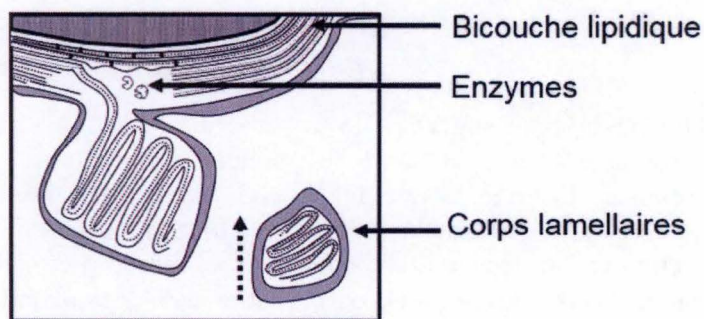


Figure 3 : Sécrétion des corps lamellaires

Les lipides sont libérés par les corps lamellaires qui sont formés durant la kératinisation à l'interface entre la couche granuleuse et la couche cornée. Les corps lamellaires délivrent les précurseurs lipidiques mais également les hydrolases acides associées à ces lipides. Modifié à partir de [5].

L'épiderme est organisé en quatre couches : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (**Fig 2**). Les kératinocytes basaux sont prolifératifs et les cellules produites dans cette couche basale se détachent de la jonction épidermo-dermique et migrent vers le haut de l'épiderme, tout en étant soumis à la différenciation terminale qui mène à la formation d'une couche cornée composée de kératinocytes morts. Ce programme de différenciation, encore appelé kératinisation, est génétiquement programmé et finement régulé et divers événements métaboliques et morphologiques prennent place [1].

Cette kératinisation est accompagnée donc par de profondes modifications des kératinocytes, incluant le remplacement des organites intracellulaires par un squelette protéique. Une enveloppe cornée est également formée par l'enchevêtrement de protéines spécialisées du côté cytoplasmique de la membrane plasmique. De plus, des céramides sont sécrétés par les kératinocytes de la couche granuleuse et organisés de manière à former une matrice extracellulaire qui ferme les espaces intercellulaires dans la couche cornée [1, 2, 4, 6]. L'organisation de cette couche cornée est souvent représentée par le modèle de la brique et du mortier : des cornéocytes riches en protéines entourés par une matrice de lipides extracellulaire [7]. Les lipides sont libérés par les corps lamellaires qui sont formés durant la kératinisation à l'interface entre la couche granuleuse et la couche cornée. Les corps lamellaires délivrent les précurseurs lipidiques mais également les hydrolases acides associées à ces lipides [5] (**Fig 3**). Les corps lamellaires sont formés par bourgeonnement à partir du réseau trans-golgien, une partie de l'appareil de golgi responsable de la formation de vésicules sécrétoires [8, 9].

a. La couche basale

La couche basale est constituée de kératinocytes prolifératifs et ayant la capacité de pouvoir migrer. Les kératinocytes basaux sont associés de manière fonctionnelle et structurelle avec la jonction épidermo-dermique sous-jacente via les hémidesmosomes. Cette association permet de pouvoir contrôler finement la prolifération, la migration et la différenciation à travers différents signaux.

Les kératinocytes basaux n'ont pas tous exactement le même potentiel prolifératif. Certains kératinocytes basaux sont des cellules souches qui, en se divisant, vont donner naissance à une autre cellule souche et une cellule que l'on appelle cellule d'amplification transitoire. Cette cellule d'amplification transitoire a un potentiel de division plus élevée et donnera lieu à une cellule différenciée. Il est estimé qu'il faut 28 jours à une cellule pour passer de la couche basale à sa desquamation [1].

b. La couche épineuse

La couche épineuse est ainsi nommée de par le fait qu'elle contient de nombreux desmosomes qui permettent une certaine adhésion entre les kératinocytes. Si les kératinocytes basaux sont de formes polyédriques, ceux de la couche épineuse sont plus plats et plus larges [1].

c. La couche granuleuse

Les kératinocytes de la couche granuleuse sont caractérisés par la présence de granules de kératohyaline. Ces granules contiennent plusieurs protéines et précurseurs importants, tels que la profilaggrine, ou encore la loricrine. La conversion de profilaggrine en filaggrine se réalise durant la transition du kératinocyte de la couche granuleuse vers la couche cornée. La filaggrine promeut l'agrégation des filaments de kératine.

Bien que les granules de kératohyaline soient d'abord observés dans la couche épineuse, ils sont actifs à l'interface entre la couche granuleuse et la couche cornée. Ce sont des organites qui proviennent de l'appareil de Golgi et qui délivrent des précurseurs lipidiques.

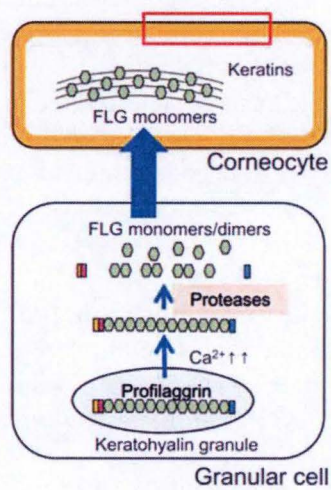


Figure 4 : La pro-filaggrine est le précurseur de la filaggrine

La filaggrine est obtenue par déphosphorylation de la profilaggrine et par clivage grâce à des protéases à sérine. Modifié à partir de [4].

Il est à noter qu'une couche transitionnelle existe entre la couche granuleuse et la couche cornée : les kératinocytes de la couche granuleuse sont non seulement responsables de la synthèse des protéines impliquées dans la kératinisation mais également de leur propre destruction. C'est ainsi que certaines enzymes sont responsables de la destruction du noyau. Les changements morphologiques et métaboliques sont typiques d'une forme d'apoptose [1].

d. La couche cornée

La couche cornée est la couche la plus superficielle de l'épiderme et est composée majoritairement de kératinocytes morts. Ces kératinocytes ont cependant une fonction importante puisqu'ils fournissent une barrière contre les substances environnantes mais empêchent également la déshydratation. Son épaisseur est variable selon la région du corps dans laquelle on se situe mais également avec l'âge, le sexe de l'individu ou encore en cas de maladie dermatologique. Comme cité plus haut, le modèle de la brique et du mortier est utilisé pour expliquer le fait que cette couche de kératinocytes fournit une barrière imperméable. [1, 7] Les kératinocytes morts, ou cornéocytes, sont larges, aplatis, et connectés par des cornéodesmosomes. Ils baignent dans une matrice inter-cellulaire enrichie en lipides et organisées en couches lamellaires. Ensemble, les desmosomes et les lipides confèrent à la peau son imperméabilité. Des filaments de kératine composent chaque cornéocyte : leur interaction avec la filaggrine permet de les condenser et de fournir aux kératinocytes une forme aplatie [10]. C'est grâce à la forme du cornéocyte que celui-ci fournit à la couche cornée son intégrité.

On peut parfois distinguer dans la couche cornée deux couches distinctes. Les cellules des couches les plus profondes de la couche cornée (la couche compacte), sont plus épaisses et ont une enveloppe cornée plus fragile. Elles lient également moins bien l'eau. Les cellules des couches les plus superficielles de la couche cornée ont une enveloppe cornée rigide et subissent une dégradation protéolytique des desmosomes qui les tiennent entre elles. Ces changements contribuent à la perte des couches les plus externes de façon telle que cette zone de l'épiderme est parfois appelée couche disjointe [1].

e. La kératinisation

Les kératinocytes épidermiques subissent une forme de différenciation terminale unique connue sous le nom de kératinisation ou de cornification. Celle-ci mène à la formation d'une barrière, la couche cornée. Différents gènes sont exprimés de manière coordonnée afin de promouvoir les composants structurels et régulateurs de la cornification [6].

De profondes modifications se mettent en place lors de la différenciation des kératinocytes.

Une enveloppe cornée est formée du côté cytoplasmique de la membrane cellulaire et est composée de protéines et de lipides. Les kératines K5 et K14 sont les principales protéines structurales produites par les kératinocytes basaux. Elles s'assemblent pour former des filaments intermédiaires de kératines qui s'étendent des desmosomes au noyau. Elles forment avec les microtubules et les microfilaments d'actine, le cytosquelette de la cellule épithéliale (Candi). Les kératines K1 et K10 sont les premières protéines exprimées lors de la cornification, lorsque les cellules migrent vers les couches supérieures de l'épiderme. Ces filaments remplacent les filaments pré-existants. Les cellules acquièrent également des granules de kératohyaline, contenant la profilaggrine – le précurseur de la filaggrine [2, 6]. La filaggrine est obtenue par déphosphorylation de la profilaggrine et par clivage grâce à des protéases à sérine (**Fig 4**) [11]. La filaggrine et les filaments de kératine constituent la majorité de la masse protéique de l'épiderme.

De plus, d'autres protéines structurelles telles que l'involucrine, la loricrine, la trichohyaline et les protéines SPRs (Small proline-rich proteins) sont synthétisées. Des enchevêtrements de ces

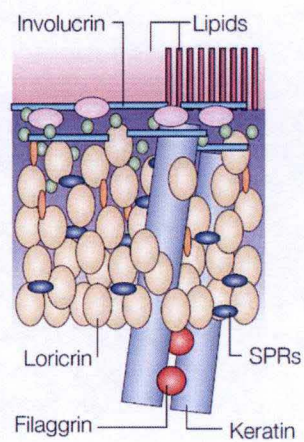


Figure 5 : Formation de l'enveloppe cornée

Différentes protéines structurelles permettent de former l'enveloppe cornée. De plus, la filaggrine permet de créer une structure protéique avec les filaments de kératine. Des lipides sont également présents. Modifié à partir de [6].

protéines spécialisées par la formation de liens covalents N^ε-(γ-glutamyl)lysine sont réalisés grâce à des enzymes importantes, des transglutaminases. L'enveloppe lipidique est une structure semblable à la membrane plasmique (**Fig 5**) [6, 10].

Les corps lamellaires enrichis en lipides, glycosphingolipides, stérols, phospholipides et enzymes associées peuvent en réponse à certains signaux fusionner avec la membrane plasmique et déverser leur contenu dans les espaces intercellulaires par exocytose. Les lipides ainsi présents subissent des modifications et sont arrangés en lamelles inter cellulaires, grâce à l'interaction avec l'enveloppe cornée. Les lipides polaires deviennent non polaires, tandis que l'hydrolyse des glycosphingolipides permet la libération de céramides. Des acides gras libres sont obtenus grâce à la transformation des phospholipides. Il y a donc trois classes majeures de lipides présent dans la couche cornée : du cholestérol, des acides gras et des céramides [4, 6, 10]

La couche cornée est donc composée de cellules aplaties, mortes, totalement différenciées, appelées cornéocytes. Ils sont donc composés majoritairement de filaments de kératine intégrés dans une matrice de filaggrine et entourés par des lipides. Les cornéocytes sont attachés ensemble par des cornéodesmosomes, des desmosomes modifiés, qui sont dégradés de manière protéolytique dans les couches supérieures de la couche cornée afin de donner la desquamation de ces cellules et le renouvellement de l'épiderme [6].

f. Autres types cellulaires présents dans l'épiderme

- Le mélanocyte

Les mélanocytes sont des cellules situées dans les couches basales de l'épiderme ainsi que dans les follicules pileux. Ils sont responsables de la synthèse de la mélanine. Des prolongements cellulaires permettent aux mélanocytes d'entourer les kératinocytes et de leur transférer la mélanine via des vésicules appelées mélanosomes. Ces mélanosomes peuvent synthétiser de l'eumélanine ou de la pheomélanine ; ils donneront une couleur de peau différente et ceci est déterminé génétiquement. Le transfert des mélanosomes vers les kératinocytes peut être stimulé par les ultraviolets et par les hormones produites par les kératinocytes telles que la MSH. Lors de la différenciation des kératinocytes, les mélanosomes sont dégradés par les enzymes lysosomales [1].

- Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans sont des cellules présentatrices d'antigènes présentes dans l'épiderme. Ce sont des cellules dendritiques résidant dans les couches suprabasales. Elles sont également trouvées dans d'autres épithélia, comme l'œsophage ou encore la rate. Ces cellules expriment ont la capacité de se mouvoir à travers les tissus et de pénétrer les membranes, ainsi que la jonction épidermo-dermique. Elles peuvent donc, sous certains signaux, voyager librement et remplir leur rôle de cellules immunitaire. Elles contiennent des granules de Birbeck qui sont spécifiques à ce type cellulaire dont la fonction est encore inconnue.

Les cellules de Langerhans sont les cellules responsables de la reconnaissance et de la présentation d'antigènes dans la peau à des lymphocytes T. Lorsque la cellule de Langerhans internalise les antigènes, ceux-ci sont processés et ensuite exprimés à la surface de la cellule via le complexe majeur d'histocompatibilité. L'interaction de l'antigène et du CMH avec le lymphocyte T est rendue possible par une liaison à travers diverses molécules d'adhésion. Ensuite, le lymphocyte T est activé en conjonction avec la libération de cytokines [1].

- Les cellules de Merkel

Les cellules de Merkel sont des cellules intra-épithéliales spécialisées neuroendocrines de l'épiderme et du derme. Elles sont situées près des kératinocytes et sont liées à ceux-ci via des desmosomes. Elles sont situées dans les crêtes des épidermes et dans les gaines externes des follicules pileux, et peuvent s'assembler en structure spécialisées. Elles produisent des facteurs « nerve growth factor » lorsqu'elles sont situées dans l'épiderme tandis que les cellules de Merkel situées dans le derme possèdent des récepteurs à ces facteurs. Elles fonctionnent comme des mécanorécepteurs et pourraient contribuer au développement de certains plexus nerveux dans le derme [1].

D. Régulation de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes et signalisation

a. Facteurs de croissance

Des facteurs de croissances sont importants afin de promouvoir la prolifération et la différenciation des kératinocytes. Les facteurs de croissances essentiels incluent l'EGF (Epidermal Growth Factor), le TGF- α (Transforming Growth Factor) ; le KGF (Keratinocyte Growth Factor) et le TGF- β . Si les trois premiers agissent en tant que mitogènes, le TGF- β promeut la différenciation des kératinocytes [1].

La famille des facteurs de croissance de l'EGF comprend l'EGF, le TGF- α , l'HB-EGF, l'amphiréguline, la bétacelluline. Des précurseurs ancrés à la membrane sont clivés enzymatiquement et les formes solubles sont libérés des cellules pour agir en tant que facteur de croissance paracrine [12].

L'EGF est un facteur de croissance dont l'activité est importante sur une large gamme de tissus. Dans la peau, l'EGF est produit par les kératinocytes et interagit avec un récepteur propre à l'EGF. Il est important pour diverses activités biologiques telles que la croissance des fœtus, l'inhibition de la sécrétion de l'acide gastrique mais également la croissance des kératinocytes et la kératinisation. (1)

Le TGF- α est sécrété par les kératinocytes et promeut leur prolifération d'une manière autocrine. De plus, il est surexprimé dans les peaux atteintes de psoriasis [12].

L'amphiréguline est également importante en tant que facteur de croissance autocrine. L'amphiréguline est capable d'interagir avec les récepteurs à l'EGF, et est présent de manière beaucoup plus importante dans les peaux atteintes de maladies hyper prolifératives telles que le psoriasis. Le KGF est un autre facteur de croissance produit par les fibroblastes présents dans la peau et agit comme un facteur mitogénique pour les kératinocytes. Le récepteur au KGF est exprimé majoritairement par les cellules épithéliales [1].

Le TGF- β fait partie d'une large famille de protéines comprenant des isoformes variées de TGF- β et d'autres facteurs. C'est une protéine qui a également divers effets biologiques. Le TGF- β 1 inhibe la croissance des kératinocytes [12].

b. Cytokines et rétinoïdes

Des cytokines participent également à la régulation de la prolifération des kératinocytes comme par exemple l'interleukine-1 α , l'IL-6 et l'IL-8. D'autres facteurs importants de régulation incluent les récepteurs aux stéroïdes. Par exemple, les rétinoïdes activent différentes réponses géniques via des récepteurs spécifiques, les RAR (retinoids acid receptors) et RXR (retinoids X receptors). La concentration de rétinoïdes dans la peau est importante : une concentration de rétinoïdes inadaptée peut mener à une mauvaise différenciation [1]. La vitamine D3 est également importante pour l'homéostasie de l'épiderme. Sa forme active diminue la prolifération et active la différenciation [1, 12].

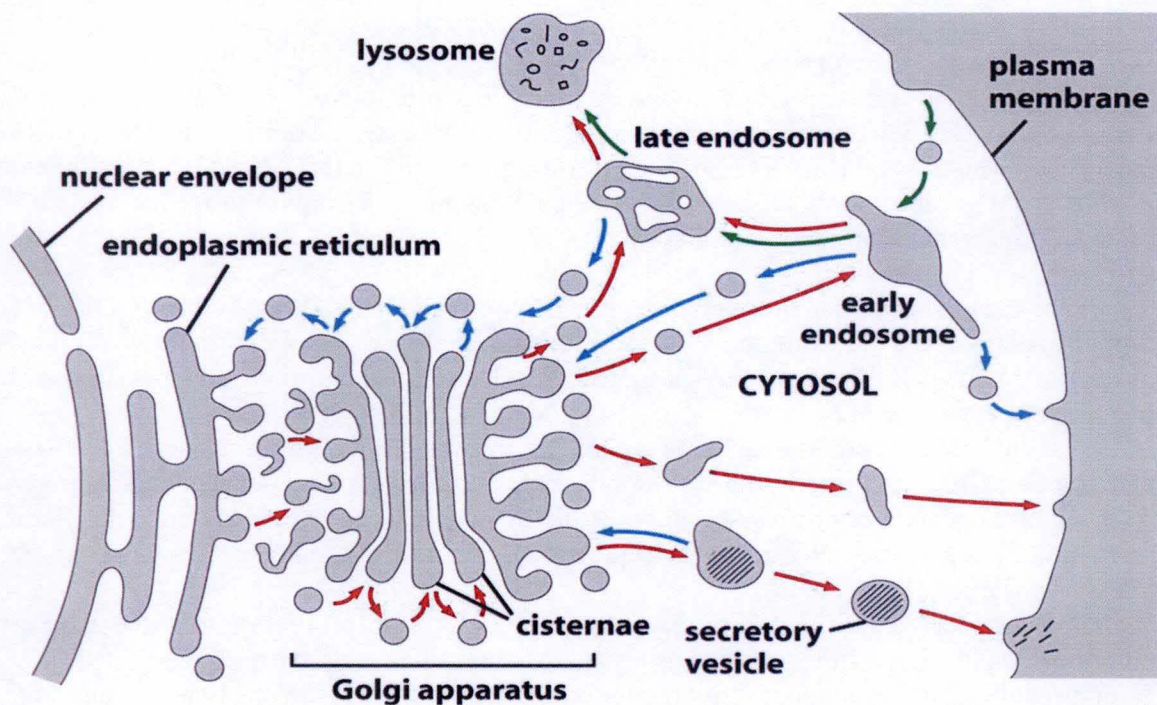


Figure 6 : L'exocytose permet le transport de protéines à travers la cellule vers la membrane plasmique

Le réseau trans-golgien trie les protéines et les produits de sécrétion selon leurs endroits de destination. Il y a ceux adressés aux lysosomes via les endosomes, ceux adressés à la surface cellulaire et ceux adressés aux vésicules impliquées dans la sécrétion régulée. Ils peuvent aussi être renvoyés vers un compartiment antérieur. L'exocytose permet le transport de protéines à partir du réseau trans-golgien vers l'espace extracellulaire [9].

c. Calcium

La concentration en ions Ca^{2+} est un élément important également pour la régulation de la prolifération des kératinocytes [10, 13]. Effectivement, il existe un gradient de calcium in vivo dans l'épiderme : la concentration de calcium augmente de la couche basale à la couche granuleuse. Les concentrations de calcium les plus élevées sont donc retrouvées dans cette dernière. Une augmentation de la concentration en calcium promeut la différenciation. Cette haute concentration en calcium est donc requise pour plusieurs fonctions dans l'épiderme, notamment la formation des desmosomes mais également l'enchevêtrement des protéines structurales par la transglutaminase. A contrario, les concentrations de calcium dans la couche cornée sont basses de par la sécheresse de cette dernière et son contenu élevé en lipides [10]. De plus, lorsque les kératinocytes sont mis en culture dans un milieu contenant 0,05 mM de calcium, ils prolifèrent en monocouche tandis qu'un apport d'une concentration de 1 mM de calcium déclenche la stratification des cellules et la différenciation épidermique [14].

2. Transport vésiculaire intracellulaire

De nombreux phénomènes d'exocytose ont lieu dans la peau, que ce soit de manière physiologique ou pathologique. Les voies de biosynthèses et de sécrétion apportent continuellement des lipides ou des protéines à la surface cellulaire ou dans l'espace intercellulaire. Il y a également un phénomène d'endocytose, processus où la cellule est capable d'internaliser des parties de sa membrane plasmique afin de les recycler ou de les livrer vers les lysosomes afin de les dégrader. Les protéines peuvent se déplacer à l'intérieur de la cellule grâce à des vésicules de transport qui peuvent bourgeonner et fusionner. Chaque vésicule est sélective de façon à adresser les protéines à l'endroit adéquat. Par exemple, une protéine destinée à la surface cellulaire ne doit pas fusionner avec un autre organite. Dans la voie de biosynthèse et sécrétion, les protéines sont transportées du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique ou aux lysosomes, tandis que dans la voie d'endocytose les molécules ingérées sont compactées dans des vésicules, qui sont transportées vers les endosomes puis les lysosomes [9].

Afin de pouvoir être triées, les protéines néo-synthétisées sont maturées et passent d'abord par l'appareil de golgi. Celui-ci est composé de plusieurs compartiments, et peut être séparé en cinq parties : le réseau cis-golgien (CGN), les citernes cis, les citernes médianes, les citernes trans et le réseau trans-golgien (TGN) [9].

Le réseau trans-golgien trie les protéines et les produits de sécrétion selon leurs endroits de destination. Il y a ceux adressés aux lysosomes via les endosomes, ceux adressés à la surface cellulaire et ceux adressés aux vésicules impliquées dans la sécrétion régulée. Ils peuvent aussi être renvoyés vers un compartiment antérieur. L'exocytose permet le transport de protéines à partir du réseau trans-golgien vers l'espace extracellulaire. Toutes les cellules ont une voie sécrétoire constitutive qui permet le transport directement des protéines vers la surface cellulaire. De plus, des cellules spécialisées montrent une voie sécrétrice régulée, où les protéines sont premièrement stockées et concentrées dans des vésicules de sécrétion. Ces vésicules libèrent leur contenu par exocytose habituellement en réponse à des signaux spécifiques (Fig 6) [9].

3. Exocytose d'ATP vésiculaire

L'exocytose permet à la cellule d'envoyer tout un arsenal de signaux. La concentration d'ATP intracellulaire varie de 3 à 10 mM en conditions normales, alors que les quantités d'ATP extracellulaires varient largement, de picomoles à micromoles [15, 16]. Les niveaux basaux d'ATP extracellulaires reflètent un état stable mais dynamique [17]. Ces concentrations extracellulaires sont régulées finement par la présence d'ecto-enzymes présentes à la

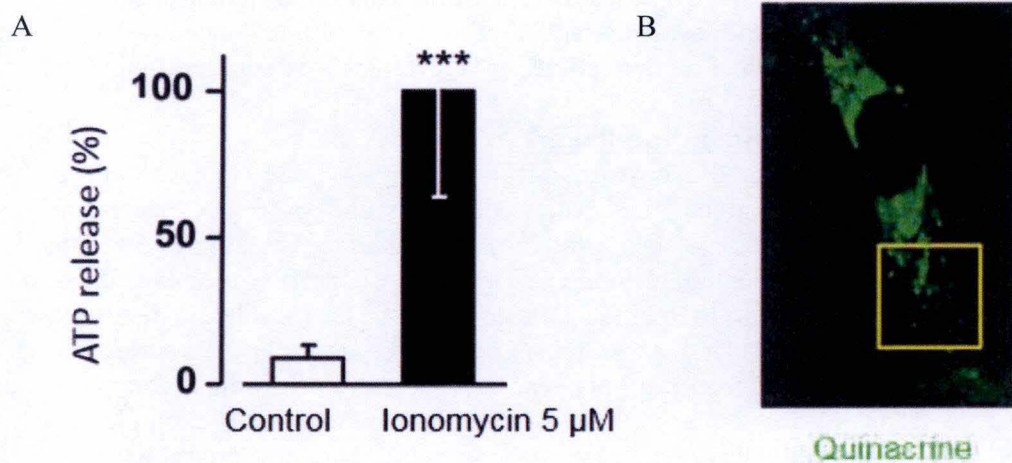


Figure 7 : L'ionomycine induit l'exocytose d'ATP

L'ionomycine induit l'exocytose d'ATP : d'une part de l'ATP est libéré dans le milieu extracellulaire (A), d'autre part les vésicules d'ATP sont visualisées grâce à la quinacrine, une sonde fluorescente (B). Modifié à partir de [18].

membrane, métabolisant les nucléotides extracellulaires. La plupart de ces enzymes sont des nucléotidases, mais il y a également des phosphodiesterases [17].

Quand les cellules sont stressées, elles peuvent relâcher de l'ATP qui jouerait un rôle important dans les réponses immunitaires [15, 19]. Par exemple, de l'ATP peut être relâché dans le milieu extracellulaire suite à une cytolysse ou un stress mécanique. Ceci active des récepteurs purinergiques dans les cellules avoisinantes, menant à la production d'inositol tri-phosphate (IP₃) et à la libération d'ions Ca²⁺. Ces ions Ca²⁺ stimulent la sécrétion d'ATP à travers l'exocytose [19, 20].

L'ATP peut être relâché via les voies sécrétrices dans plusieurs types cellulaires comme les astrocytes, les cellules endothéliales mais également les cellules épithéliales. Il est important de séparer les tissus excitatoires et les tissus non excitatoires, et les mécanismes sous-jacents à l'exocytose de l'ATP ne sont pas encore clairs et diffèrent probablement d'un type cellulaire à l'autre [18, 21].

Plusieurs mécanismes sont impliqués. Les transporteurs ABC tels que le CFTR sont impliqués dans la sortie d'ATP à travers des canaux ioniques. Les jonctions gap, les canaux membranaires, les semi canaux et les récepteurs P2 sont également impliqués. De plus, une cytolysse mais également l'exocytose de vésicules permettent de sécréter de l'ATP. La libération d'ATP par les tissus excitatoires peut ressembler à la libération de neurotransmetteur. Les mécanismes moléculaires pourraient être liés aux protéines SNARE [17].

En ce qui concerne les tissus non excitatoires, l'ATP peut être libéré de différentes manières : une stimulation mécanique, de façon basale, et de façon pharmacologique [17]. Il a été montré que l'ATP peut médier la communication entre les kératinocytes. En présence de neurones, des kératinocytes sont capables d'exprimer des récepteurs purinergiques et une augmentation de la concentration intracellulaire en ions Ca²⁺ a lieu grâce à l'ATP [19, 20, 22]. Ces deux types cellulaires sont capables d'interagir ensemble.

Les nucléotides extracellulaires permettent d'activer deux types de récepteurs purinergiques, appelés P2X et P2Y [17]. Les récepteurs P2X sont des canaux qui permettent l'entrée de cations extracellulaires en réponse à l'ATP. Ils comprennent sept familles et il se peut que ces récepteurs forment des hétéro-oligomères ou des homo-oligomères. Ils interviennent dans la neurotransmission rapide. Les récepteurs P2Y sont des récepteurs couplés à la protéine Gq, ou Gi [17].

Récemment, un transporteur vésiculaire de nucléotide (VNUT) a été découvert [23]. Il permet de transporter l'ATP cytosolique dans des vésicules. De plus, l'expression de ce transporteur est plus élevée dans la couche granuleuse de l'épiderme, dans laquelle de nombreux phénomènes d'exocytose sont observés. Ces vésicules contenant de l'ATP peuvent être visualisées dans les kératinocytes *in vitro* grâce à la quinacrine, une sonde fluorescente (Fig 7) [18]. De manière intéressante, une déplétion en cholestérol induite par la méthyl- β -cyclodextrine dans des kératinocytes induit une libération d'ATP, ce qui favorise la réparation tissulaire épidermique et l'homéostasie [21]. De plus, l'exocytose d'ATP peut être induite par le calcium. Effectivement, des études récentes ont montré que des cellules stressées peuvent libérer de l'ATP d'une manière calcium dépendante [17, 18].

4. Relocalisation de LAMP1

Durant les dernières étapes de la différenciation épidermique, le calcium extracellulaire entre dans les kératinocytes. Il a été montré qu'en induisant une augmentation de la concentration du calcium cytosolique par l'utilisation d'un ionophore, l'entrée de calcium dans les kératinocytes déclenche l'exocytose des lysosomes [24].

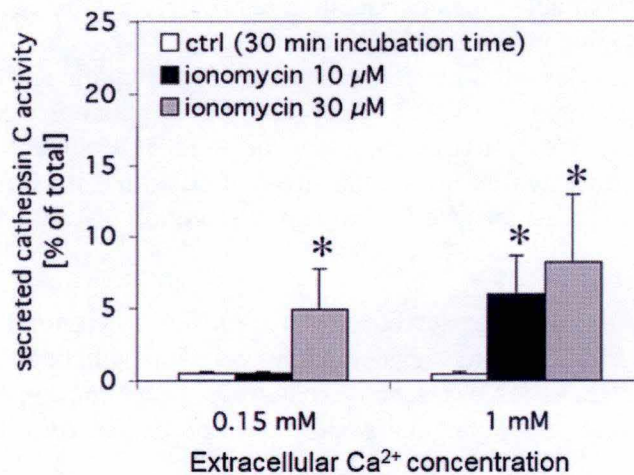


Figure 8 : L'ionomycine induit une libération de la cathepsine C

Des protéines solubles lysosomales sont libérées dans le milieu de culture par exocytose. La cathepsine C est une exopeptidase lysosomale soluble.

Lorsque les kératinocytes sont incubés avec 30 µM d'ionomycine, on peut observer une exocytose de cathepsine D importante après une heure. Modifié à partir de [24].

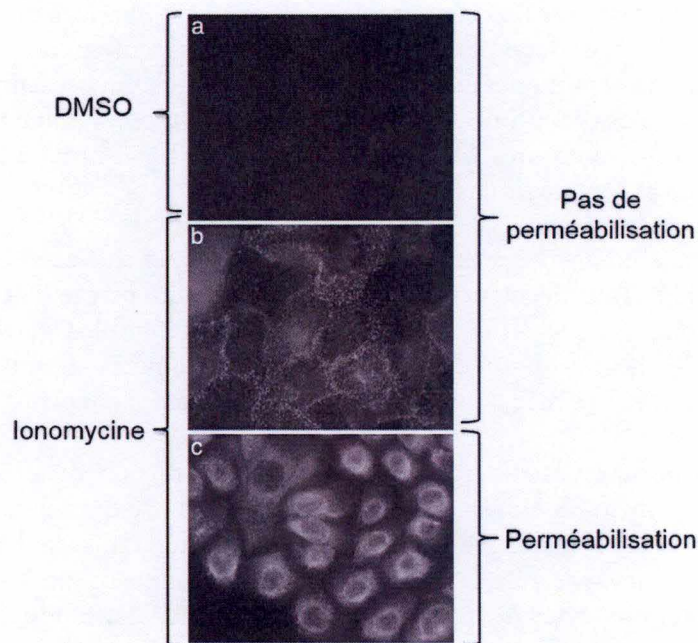


Figure 9 : L'ionomycine induit une redistribution de LAMP1 en surface des kératinocytes

Des kératinocytes sont incubés avec de l'ionomycine et du DMSO (contrôle négatif). Lorsque les cellules sont perméabilisées, un signal intense périnucléaire est observé. Lorsque les cellules ne sont pas perméabilisées, un signal apparaît en surface quand elles sont incubées avec l'ionomycine. Modifié à partir de [24].

Les lysosomes sont des organites spécialisés des cellules eukaryotes. Ils forment un compartiment acidifié dans lesquels divers éléments sont capturés par phagocytose ou par autophagie. De plus, ces organelles peuvent être également responsables d'exocytose.

Le gradient de calcium responsable de l'exocytose des corps lamellaires peut également influencer le comportement des lysosomes, qui ainsi libèrent leurs enzymes lysosomales [24]. Dans cette optique, un ionophore particulier, l'ionomycine, a été utilisé par Ralph Jans afin d'augmenter la concentration intracellulaire en calcium [24]. Ceci provoque un bourgeonnement des membranes et la formation d'enveloppes cornées. La transglutaminase, responsable de l'enchevêtrement de protéines formant cette enveloppe cornée est induite. L'activité de cette enzyme est donc critique pour la kératinisation [2, 6]

Durant les trente premières minutes, des bourgeonnements sont observés mais après une heure ceux-ci disparaissent. Ces altérations ne sont pas liées immédiatement à la mort cellulaire.

Des protéines solubles lysosomales sont libérées dans le milieu de culture par exocytose. La cathepsine C est une exopeptidase lysosomale soluble. Son activité dans les kératinocytes non traités est faible, suggérant une exocytose lysosomale constitutive faible. Lorsque les kératinocytes sont incubés avec 30 μ M d'ionomycine, on peut observer une exocytose de cathepsine D importante après une heure. Ce phénomène est également dépendant du calcium (Fig 8).

De plus, LAMP1, une protéine membranaire associée aux lysosomes, apparaît à la surface cellulaire des kératinocytes. Deux approches furent utilisées afin de détecter cette apparition : la biotinylation des protéines exposées à la surface, et un marquage immunofluorescent de LAMP1. Lorsque l'on ne perméabilise pas les kératinocytes, il n'y a pas de signal observé contrairement aux cellules incubées avec l'ionomycine. Par contre, lorsque les kératinocytes sont perméabilisés, un signal périnucléaire est observé (Fig 9) [24]. Dans le cadre de ce mémoire, seul le marquage immunofluorescent de LAMP1 fût utilisé afin d'étudier les fonctions potentielles de TMEM45A.

5. Réponse immunitaire des kératinocytes

Les kératinocytes sont des acteurs importants dans la réponse immunitaire suite à un stress cellulaire [25, 26]. Les kératinocytes sont capables de libérer des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , mais également des chimiokines telles que l'interleukine-8 (IL-8) [27].

La production de l'IL-8, aussi connue sous le nom de CXCL-8, est stimulée par d'autres cytokines et n'est pas constitutive [28]. Elle est également stimulée suite à une incubation avec la méthyl- β -cyclodextrine, un agent déplaçant le cholestérol [29]. L'IL-8 est sécrétée par des vésicules sécrétrices [30, 31]. Elle est associée au processus de réparation cutanée, mais également impliquée dans certaines maladies dermatologiques telles que le psoriasis [31].

Le TNF- α quant à lui, est situé dans le réseau trans-golgien et est la première cytokine libérée en cas de réaction inflammatoire [32, 33]. Le TNF- α est également libéré en présence de lipopolysaccharide (LPS), un produit bactérien [1].

Il a été montré qu'une incubation de cellules avec la flagelline stimule la libération d'IL-8 et de TNF- α [34].

6. TMEM45A

A. Caractéristiques du gène

La kératinisation et la différenciation des kératinocytes ne sont pas encore parfaitement comprises. Cependant, de récentes études transcriptomiques ont permis d'identifier certains acteurs encore inconnus, incluant un gène particulièrement exprimé lors des dernières étapes de la différenciation des kératinocytes : TMEM45A (DERP7, FLJ10134 ou DNAPTPA).

Show/hide columns (1 hidden)								Filter		
Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt	RefSeq	Flags		
TMEM45A-001	ENST00000323523	1667	275aa	Protein coding	CCDS2937	Q9NWC5	NM_018004 NP_060474	TSL:1	GENCODE basic	APPRIS P1
TMEM45A-002	ENST00000403410	1910	291aa	Protein coding	-	J3KQ06	-	TSL:5	GENCODE basic	
TMEM45A-004	ENST00000449609	874	191aa	Protein coding	-	C9J9Z5	-	CDS 3' incomplete	TSL:3	
TMEM45A-003	ENST00000462884	560	No protein	Processed transcript	-	-	-	TSL:2		
TMEM45A-005	ENST00000485260	452	No protein	Processed transcript	-	-	-	TSL:2		
TMEM45A-006	ENST00000488904	431	No protein	Processed transcript	-	-	-	TSL:3		
TMEM45A-007	ENST00000489060	4615	No protein	Retained intron	-	-	-	TSL:1		

Show/hide columns (1 hidden)								Filter		
Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt	RefSeq	Flags		
TMEM45B-001	ENST00000281441	2234	275aa	Protein coding	CCDS8482	Q96B21	NM_138788 NP_620143	TSL:2	GENCODE basic	APPRIS P1
TMEM45B-002	ENST00000524567	1639	275aa	Protein coding	CCDS8482	Q96B21	-	TSL:1	GENCODE basic	APPRIS P1
TMEM45B-004	ENST00000525709	247	No protein	Processed transcript	-	-	-	TSL:5		
TMEM45B-005	ENST00000527754	888	No protein	Retained intron	-	-	-	TSL:5		
TMEM45B-003	ENST00000529381	515	No protein	Retained intron	-	-	-	TSL:2		

Figure 10 : Liste des transcrits de TMEM45A et TMEM45B [35]

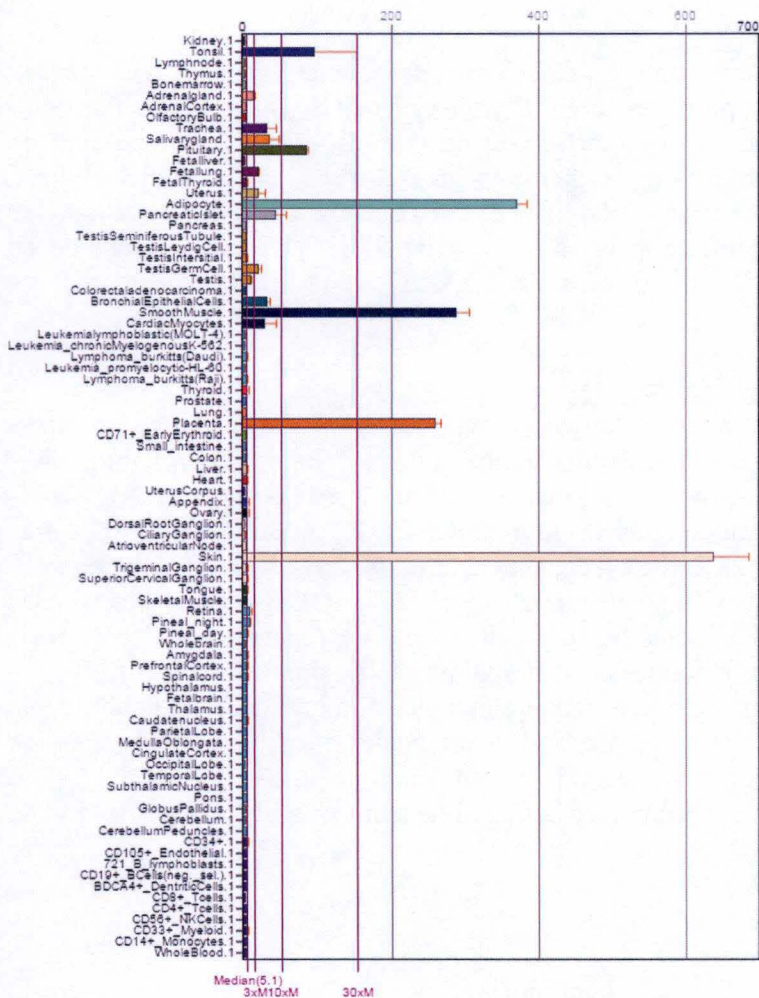


Figure 11 : Expression de l'ARNm de TMEM45A dans différents tissus humains [36]

Ce gène, localisé sur la région 12,2 du long bras du chromosome 3 humain, encode la protéine transmembranaire 45A. Sa taille est de 828 nucléotides et est composé de 11 introns et 9 exons [37]. Il y a sept transcrits qui sont codants mais seulement trois isoformes de la protéine existent (**Fig 10**). Ces isoformes résultant d'épissages alternatifs ont des poids moléculaires différents (21,9, 31,7, 33,5 kDa) contenant 275, 291 ou 191 acides aminés et un nombre variable de domaines transmembranaires prédits [35, 38]. Selon BioGPS, la peau est l'organe où TMEM45A est le plus exprimé en terme d'ARN messager (**Fig 11**) [36]. La protéine transmembranaire 45A comprend donc entre 3 et 7 domaines transmembranaires (**Fig 12**).

De plus, elle contient un domaine DUF716 (Domain of unknown function), retrouvé dans les protéines de la famille TMEM45. Le gène est conservé parmi les espèces puisqu'il possède 72 orthologues. Cependant, on ne retrouve pas d'orthologue chez la drosophile, indiquant que TMEM45A est important pour des organismes plus complexe [35].

La majorité des données disponibles sur TMEM45A proviennent d'outils informatiques et d'analyses transcriptomiques. Il a notamment été montré que l'expression de TMEM45A est augmentée en hypoxie [39] et que le promoteur de TMEM45A possède une séquence de liaison pour le facteur de transcription HIF-1 [40, 41]).

De plus, son expression est également augmentée dans certaines pathologies dermiques, telles que le psoriasis et la kératose actinique [42].

B. Implication dans le cancer et la chimiorésistance

Des recherches effectuées en URBC à l'UNamur par Lionel Flamant ont montré que le gène TMEM45A est impliqué dans la protection contre l'apoptose induite par la chimiothérapie en conditions hypoxiques dans les cellules cancéreuses du sein et du foie [41]. Effectivement, le niveau d'expression de TMEM45A est augmenté lorsque les cellules sont exposées à un agent chimiothérapeutique en conditions hypoxiques. Le gène TMEM45A joue un rôle essentiel dans la protection induite par l'hypoxie contre l'apoptose : lorsque des siRNA sont utilisés, l'expression de TMEM45A est inhibée l'apoptose des cellules est observée de manière plus fréquente quand elles sont soumises à l'agent thérapeutique.

De plus, la surexpression de TMEM45A dans les tumeurs du sein est associée avec un haut risque de récurrence. TMEM45A pourrait donc influencer la survie et la croissance des cellules cancéreuses [41].

Dans un autre laboratoire, il a été montré que TMEM45A est important pour la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses ovariennes humaines [43]. En effet, une invalidation de TMEM45A dans des lignées cancéreuses ovariennes entraîne une diminution de la prolifération des cellules, de l'adhérence des cellules et de la migration cellulaire à travers une matrice synthétique. TMEM45A modulerait les voies du TGF- β .

Dans le cancer de la vessie, l'expression de TMEM45A est élevée [44] et constitue donc un biomarqueur important.

Réunies ensemble, ces différentes données fournissent un sens à ces recherches : étudier et identifier le rôle de TMEM45A et pourrait conférer des nouvelles idées et des avancées considérables en terme de recherche contre différents cancers.

C. Localisation de la protéine transmembranaire 45A dans la peau et rôle dans le trafic intracellulaire

TMEM45A est fortement induit chez les kératinocytes lors de leur différenciation dans le modèle de différenciation induite par la confluence mais également lorsque la différenciation est induite par le calcium extracellulaire. De récentes recherches ont montré que l'expression du gène TMEM45A est élevée dans les kératinocytes les plus différenciés de l'épiderme, et que

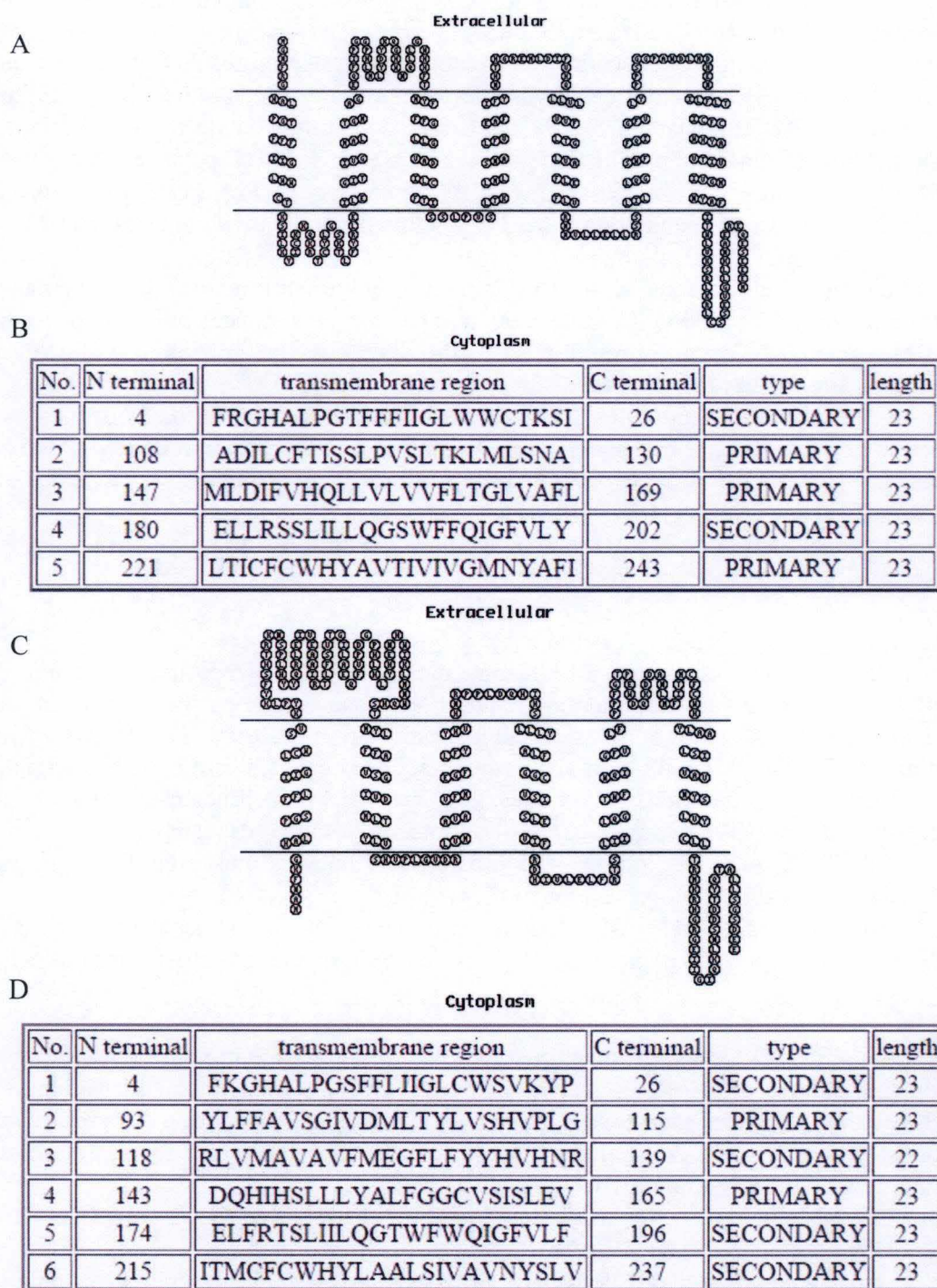


Figure 12 : Structure secondaire prédite de la protéine transmembranaire 45A et de la protéine transmembranaire 45B

Structure secondaire prédite de la protéine transmembranaire 45A (A,B) et 45B (C,D) selon <http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/memset.py> (A,C) ou <http://harrier.magahama-i-bio.ac.jp/sosui> (B,D).

ceci est corrélé à la kératinisation [45]. TMEM45A est classé 32^e parmi les gènes les plus exprimés dans la peau [42]. La protéine transmembranaire 45A est localisée dans les couches épidermiques granuleuses dans la peau humaine. Il a été également montré que la protéine transmembranaire 45A s'accumule partiellement dans le trans-golgi et le TGN des kératinocytes. Par contre, elle n'est pas retrouvée dans le compartiment lysosomal (**Fig 13**) [45]. Puisque l'exocytose permet le transport des protéines du TGN vers la surface cellulaire, il a été proposé lors de ce mémoire que la protéine transmembranaire 45A aurait un rôle dans la sécrétion des kératinocytes.

Il a également été montré que TMEM45A n'est pas nécessaire à la morphogenèse de l'épiderme ni à la kératinisation. Effectivement, l'histologie du tissu dans le modèle murin TMEM45A^{-/-} ne présente pas de différence avec le tissu provenant de souris sauvages [46]. De plus, l'inactivation de TMEM45A dans des kératinocytes épidermiques humains normaux ne donne aucun phénotype et n'empêche pas l'épiderme de se reconstruire. Cependant, des granules denses ont été observés dans des kératinocytes invalidés au microscope optique à contraste de phase. Etant donné que la protéine transmembranaire 45A est localisée dans le trans-golgi et le réseau trans-golgien dans les kératinocytes, il est possible que l'inactivation du gène perturbe le tri des protéines au niveau du réseau trans-golgien ainsi que les processus de sécrétion. Un effet a également été observé sur des marqueurs des endosomes précoces et du rétrograde, suggérant que l'inactivation de TMEM45A perturbe la connexion entre le réseau trans-golgien et les endosomes précoces [47].

D. TMEM45A chez la souris

En parallèle des études d'Aurélien Hayez sur la localisation et la fonction de la protéine transmembranaire 45A chez des kératinocytes humains normaux, d'autres études ont été menées en URBC par Edith Roegiers sur la souris [46]. Effectivement, l'épiderme murin est le tissu dans lequel TMEM45A est essentiellement exprimé. TMEM45A a également été décrit comme un gène spécifique de l'épiderme chez la souris [42], et pourrait être impliqué dans la croissance épidermique des souris [48]. Chez la souris, le gène *Tmem45a* ne génère que deux transcrits codants. Les deux isoformes de la protéine transmembranaire 45A présentent 273 ou 47 acides aminés. La première possède des domaines transmembranaires prédits [35]. Afin d'avoir un modèle *in vivo*, et en parallèle des modèles *in vitro*, des souris knock-out pour TMEM45A ont été générées afin d'étudier le rôle de TMEM45A dans l'épiderme murin. Ces souris TMEM45^{-/-} sont viables, fertiles et ne présentent pas de phénotype apparent [46]. Il est donc possible que TMEM45A ne soit pas un gène essentiel pour le développement de la souris. Il est également possible que le phénotype obtenu ne soit pas visible directement ou que TMEM45A n'ait pas de rôle important en condition physiologique. Il est également possible que la délétion du gène soit compensée par un autre membre de la famille TMEM45.

7. Famille TMEM45

La famille TMEM45 encode des protéines transmembranaires hypothétiques exprimées uniquement chez les eucaryotes [49]. Chez l'homme, elle contient trois membres considérés comme des paralogues : TMEM45A, TMEM45B et TEDDM1 [38]. TEDDM1 code pour un seul transcrit codant.

8. TMEM45B

A. Caractéristiques

La protéine transmembranaire 45B, codée par TMEM45B, contient également 275 acides aminés. Le gène TMEM45B est situé sur la région 24.3 du long bras du chromosome 11 humain. Le gène serait fort conservé chez le chimpanzé, le chien, la souris et le rat [37]. La protéine

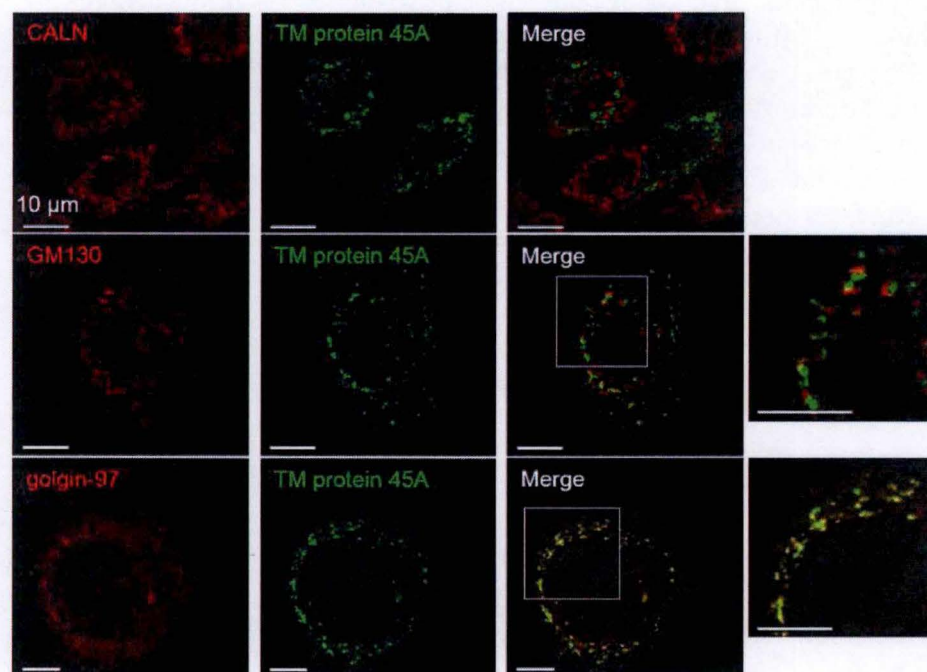


Figure 13 : Localisation dz la protéine transmembranaire 45A

La protéine transmembranaire 45A s'accumule partiellement dans le trans-golgi et le TGN des kératinocytes. Sa localisation a été comparée à la localisation de divers marqueurs du système membranaire : GM-130 en tant que protéine du cis-golgi, Golgin-97 en tant que protéine du trans-golgi, et la calnexine en tant que chaperone du réticulum endoplasmique [45]

transmembranaire 45B contiendrait 5 ou 6 domaines transmembranaires (**Fig 12**) et a un poids moléculaire de 31,8 kDa [38]. TMEM45B code pour cinq transcrits (**Fig 10**) dont seulement deux codants. D'après BioGPS, le profil d'expression de l'ARNm de TMEM45B est fort différent de celui de TMEM45A : elle serait restreinte au colon et au rectum chez l'homme (**Fig 14**) [36]. Il y a 44% d'homologie entre la séquence en acides aminés de la protéine transmembranaire 45A et 45B [37].

Très peu d'informations sont disponibles sur TMEM45B. Cependant, TMEM45B pourrait être impliqué dans des cancers de la prostate ou les cancers du poumon à grandes cellules [50, 51]. Il a été montré que l'expression de TMEM45B est diminuée dans les cancers de poumon à cellules squameuses comparé aux adénocarcinomes pulmonaires de patients suite à la régulation du transcrit par différents miRNAs. De plus, il a été observé que certains domaines transmembranaires de la protéine transmembranaire 45B seraient responsables de l'agrégation thermique de cette protéine dans les gels SDS-PAGE [52].

B. Arguments en faveur de l'étude de TMEM45B

Plusieurs arguments nous ont poussés à étudier l'expression de TMEM45B. Effectivement, les travaux d'Edith Roegiers et d'Aurélié Hayez ont montré que l'invalidation de TMEM45A ne donne aucun phénotype apparent. Cette invalidation n'empêche pas l'épiderme humain ou murin de se construire de façon normale, et celui-ci garde ses fonctions physiologiques. De plus, il y a 44% d'homologie entre la séquence en acides aminés de la protéine transmembranaire 45A et 45B. La deuxième partie de ce mémoire s'est intéressée à l'hypothèse selon laquelle la protéine transmembranaire 45B pourrait compenser l'invalidation de TMEM45A.

9. Objectifs du mémoire

Ce mémoire se divise en deux parties bien distinctes : premièrement la caractérisation des fonctions de la protéine transmembranaire 45A dans l'exocytose et dans un second temps la caractérisation de l'expression et la régulation de l'expression de TMEM45B dans les kératinocytes humains normaux.

L'objectif de ce mémoire est donc tout d'abord d'analyser le rôle éventuel de la protéine transmembranaire 45A dans l'exocytose. Les phénomènes d'exocytoses seront observés à la fois dans des cultures de kératinocytes normaux et des cultures de kératinocytes invalidés pour TMEM45A. Pour ce faire, des outils permettant d'analyser l'exocytose sont mis au point afin de comparer les cultures cellulaires et épidermes reconstruits normaux avec les cultures cellulaires et épidermes invalidé(e)s pour TMEM45A.

Un marquage immuno-fluorescent des lysosomes, un marquage des vésicules d'ATP ainsi qu'un dosage de l'ATP extracellulaire après utilisation de l'ionomycine doivent permettre de confirmer les phénomènes d'exocytose. Une analyse de la libération de différentes interleukines est également prévue de par le fait que certaines interleukines sont sécrétées par des vésicules d'exocytose. Par la suite, ces mêmes outils doivent être utilisés pour analyser l'exocytose des cellules invalidées pour TMEM45A. Cette première partie est prévue uniquement sur monocouche dans un premier temps afin de caractériser l'importance de TMEM45A sur les mécanismes cellulaires. Plusieurs shRNA doivent être utilisés afin de pouvoir confirmer les résultats obtenus après invalidation de TMEM45A.

Par la suite, puisque l'invalidation de TMEM45A ne donne aucun phénotype apparent pour le moment, nous avons supposé que TMEM45B, un gène de la même famille que TMEM45A,

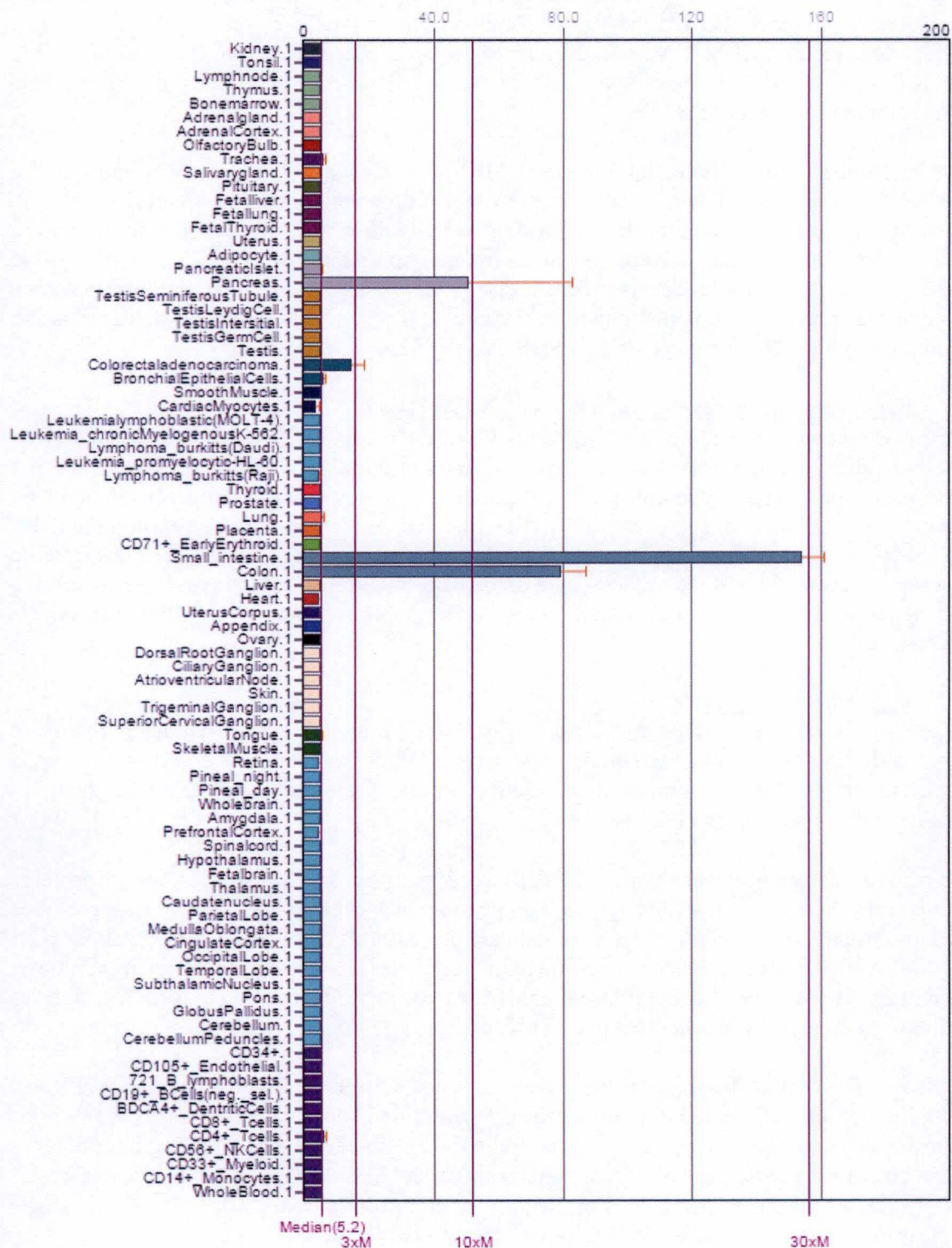


Figure 14 : Expression de l'ARNm de TMEM45B dans différents tissus humains [36]

pouvait compenser l'absence de l'expression de TMEM45A. Nous nous sommes donc intéressés à la caractérisation de l'expression de TMEM45B et la régulation de son expression dans les kératinocytes humains épidermiques normaux. Nous supposons que TMEM45B serait exprimé de façon similaire que TMEM45A au cours de la différenciation des kératinocytes mais TMEM45B n'a pas les mêmes séquences et donc n'a peut-être pas les mêmes fonctions. Il faut donc comparer également l'expression de TMEM45A et TMEM45B et mettre au point la détection de la localisation de TMEM45B. Pour ce faire, le modèle de différenciation par confluence est utilisé et l'expression de TMEM45B est analysée. Pour finir, une vérification des analyses protéiques et une analyse en spectrométrie de masse est prévue.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

1. Culture de kératinocytes épidermiques humains normaux

- **Milieu de croissance complet KBM-2** (Clonetics cat. No CC-3103) **supplémenté avec du KGM-2** (SingleQuots KGM-2 Clonetics cat. No ; CC-4152) pour atteindre des concentrations finales de 20µg/ml d'extrait de glande pituitaire, 0,5 µM d'hydrocortisone, 10 ng/ml d'EGF, 5 µg/ml d'insuline, 5 µg/ml de transferrine. Le milieu est également supplémenté avec de la pénicilline G à 50 unités/ml (Sigma Cat. No P-3032) et de la streptomycine à 50 µg/ml (Sigma cat. No S-9137).
- **Le milieu de culture complet EpiLife (Epi+)** est constitué d'EpiLife Medium (Cascade Biologics cat. No. M-EPI-500-CA) supplémenté avec des compléments de croissance pour kératinocytes humains HKGS (Cascade Biologics cat. No. S-001-5) contenant 0,2% de BPE, 0,2 ng/ml d'EGF, 5 µg/ml d'insuline, 0,18 µg/ml d'hydrocortisone, 5 µg/ml de transferrine. Le milieu est également supplémenté avec de la pénicilline G à 50 unités/ml (Sigma Cat. No P-3032) et de la streptomycine à 50 µg/ml (Sigma cat. No S-9137. (Calcium 0,06 mM ?)
- **Le milieu de culture autocrine EpiLife (Epi-)** est constitué d'EpiLife medium (Cascade Biologics cat. No. M-EPI-500-CA) supplémenté avec des acides aminés (L-isoleucine, L-histidine, L-méthionine, L-tryptophane, L-tyrosine) et de l'hydrocortisone. Le milieu est également supplémenté avec de la pénicilline G à 50 unités/ml et de la streptomycine à 50 µg/ml.
- **La solution A** contient 10 mM de glucose, 3 mM de KCl, 130 mM de NaCl, 1 mM de Na₂HPO₄.7H₂O, 0.0033 mM de Phenol Red, 30 mM de Hepes. Le pH est ajusté à 7.4. La solution est stérilisée et stockée à 4°C.
- **La solution de trypsine 25** est constituée de trypsine 0,025% (Sigma cat. No. T-9201) et d'EDTA 0,01% dans de la solution A.
- **La solution de trypsine 17** est constituée de trypsine 0,17% (Sigma cat. No. T-9201) dans de la solution A.
- **La solution bloquante** est constituée de sérum de veau fœtal dialysé (dFCS) (Clonetics, Lonza) à 2% dans de la solution A.
- **La solution de congélation** est constituée d'EpiLife Medium 60%, de DMSO 20% et de sérum de veau fœtal dialysé 20%.
- **Le milieu utilisé pour la mise en culture des épidermes reconstruit au J0** est constitué de Milieu complet EpiLife supplémenté en Ca²⁺ 1,5 mM (Sigma-Aldrich)
- **Le milieu utilisé pour la mise en culture des épidermes reconstruits à partir du J1** est constitué de Milieu complet EpiLife supplémenté en Ca²⁺ 1,5 mM (Sigma-Aldrich), de KGF (10ng/ml, R&D Systems), et de vitamine C (50 µg/ml, Sigma-Aldrich)

A. Isolement des kératinocytes et culture primaire

Les souches de kératinocytes (Normal Abdominal Keratinocytes) proviennent de peaux abdominales après abdominoplastie de patients adultes réalisées par le Dr Bienfait à la Clinique St Luc de Bouge. Ces peaux sont coupées grâce à un dermatome afin de réduire l'épaisseur du tissu. Les échantillons sont stockés à 4°C dans une solution physiologique. Ensuite, les échantillons de peaux sont coupés mécaniquement avec un scalpel en morceaux d'une surface de 1 à 2 cm³. Ils sont ensuite déposés sur une solution de trypsine T17 supplémentée avec de la gentamycine et de la fungizone. La couche cornée est exposée à l'air

tandis que le derme est immergé dans la solution de trypsine jusqu'au lendemain à 4°C. Ensuite, l'épiderme est séparé du derme mécaniquement et le tissu épidermique est placé dans du milieu de croissance KGM-2 contenant 2% de sérum fœtal dialysé. Les cellules épidermiques sont ensuite séparées mécaniquement. La suspension cellulaire est filtrée et centrifugée 10 min à 1000 RPM à 4°C. Le culot est resuspendu dans 10 ml de KGM-2 et les cellules sont comptées. Les cellules sont ensuite ensemencées dans une boîte de 175 cm² à une densité de 46000 cellules/cm² avec 25 ml de KGM-2, ce qui permet une bonne dispersion des cellules. La boîte est incubée 3 jours dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂. Finalement, le milieu est aspiré et remplacé par du milieu complet EpiLife (Epi+), puis remplacé tous les deux jours. Après deux semaines environ, les kératinocytes couvrent 50 à 60% de la boîte et sont prêts pour le passage.

B. Culture secondaire

A ce moment, les kératinocytes sont trypsinisés en remplaçant le milieu des boîtes par 8 ml de solution de trypsine 25 à température ambiante. Après 5 min, la solution de trypsine est aspirée, ce qui permet de retirer la majorité des fibroblastes et des mélanocytes présents dans la culture primaire. Le détachement des cellules est régulièrement surveillé à l'aide d'un microscope à contraste de phase. Après environ 30 minutes, les cellules sont détachées de la boîte. Des tapotements sur la boîte permettent de détacher le reste des cellules encore adhérentes et 10 ml de solution bloquante sont ajoutés rapidement. La suspension cellulaire est ensuite transférée dans un tube afin d'être centrifugée. La boîte est finalement rincée avec 10 ml de solution bloquante et cette suspension est ajoutée au tube de centrifugation. La suspension est donc centrifugée 10 min à 233 g et 4°C. Le surnageant est aspiré et le culot resuspendu dans 10 ml de milieu complet Epi+. Les cellules sont comptées et ensemencées dans des boîtes de 175m² à une densité de 10000 cellules/cm². Le milieu est changé tous les deux jours. Quand les cellules recouvrent environ 60% de la boîte, elles sont prêtes pour être congelées. Les cellules sont à nouveau détachées par trypsinisation. Après comptage, les kératinocytes sont placés dans du milieu EpiLife à une concentration de 2 millions de cellules/cm². Un volume équivalent de solution de congélation est ajouté afin d'obtenir une densité cellulaire de 1 million de cellules/cm². Des aliquots de 1ml sont placés dans des tubes de cryopréservation. Les tubes sont placés dans une boîte en polystyrène et transférées à -80°C durant minimum 24h. Finalement, les tubes sont transférés dans l'azote liquide pour une préservation plus longue.

C. Culture tertiaire

Afin d'ensemencer une boîte à partir d'une souche de kératinocytes cryopréservée, un cryotube est retiré de l'azote liquide et incubé dans un bain d'eau chaude à 37°C. Quand la suspension est totalement liquide, elle est ensemencée dans 25 ml de KGM-2 durant 24h. Ensuite, le milieu est remplacé par du milieu Epi+ tous les deux jours. Quand les kératinocytes couvrent environ 85% de la boîte, les cellules sont trypsinisées selon la méthode décrite ci-dessus, excepté que les cellules sont centrifugées durant 5 minutes. Ensuite, les cellules sont ensemencées dans de l'Epi+ dans des plaques multi-puits ou des boîtes à une densité de 7500 ou 10000 cellules/cm². Le milieu est changé tous les deux jours. Quand les cellules recouvrent à peu près 50% de la boîte, les cellules sont rincées deux fois avec de la solution A puis incubées dans du milieu de culture Epi-. Ce milieu ne contient pas de peptides. A partir de ce point, les conditions de culture sont autocrines puisque les kératinocytes peuvent fournir eux même les facteurs de croissance nécessaire à leur prolifération. Ce milieu est remplacé par de l'Epi- tous les deux jours. Les cellules sont cultivées jusque différents stade de confluence, allant de sous-confluence à post-confluence [53].

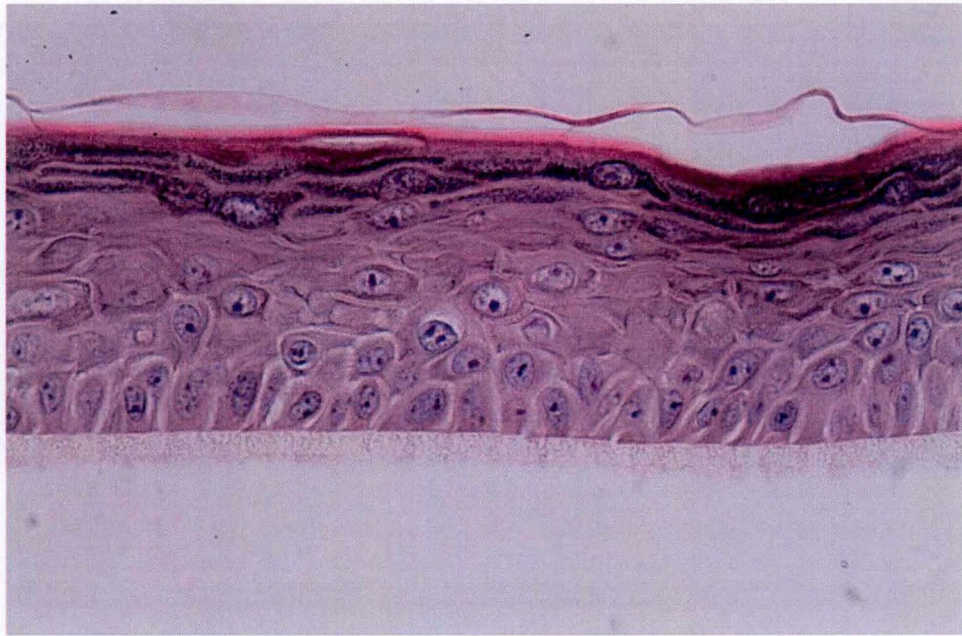


Figure 15 : Coupe d'un épiderme humain reconstruit de onze jours coloré à l'hémalun (noyaux) et à l'érythrosine (cytoplasme)

D. Culture d'épidermes humains reconstruits

Il est possible de reconstruire des épidermes humains à partir de kératinocytes ensemencés à haute densité. Pour ce faire, les cellules sont décongelées et ensemencées comme décrit ci-dessus. Lorsque les cellules couvrent environ 70 à 80% de la boîte, les kératinocytes sont détachés et la suspension cellulaire est centrifugée durant 5 minutes à 233g et 4°C. Il est important d'obtenir ce stade de confluence afin de garantir une prolifération optimale pour la mise en culture d'épidermes reconstruits. Au jour 0, les kératinocytes sont ensemencés à haute densité sur des filtres de polycarbonate. Ces filtres présentent des pores de 0,4 µm et une surface de 0,63 cm². Ces filtres, aussi appelé insert, sont placés dans des puits de culture d'une plaque multi-puits constitués de 6 puits de 3,5 cm de diamètre. Le milieu utilisé pour cette étape est le milieu Epi+ supplémenté par du calcium 1,44 mM. D'abord, 2,5 ml de milieu sont ajoutés dans chaque puits de culture. Les kératinocytes sont comptés et suspendus dans le milieu Epi+ supplémenté en calcium afin d'obtenir une densité cellulaire de 3x10⁵ cellules/ml. Ensuite, 500 µl de la suspension cellulaire sont déposés dans un insert afin d'atteindre une densité de 250000 cellules/cm². Au J1, c'est-à-dire 24h après ensemencement dans l'insert, les kératinocytes ont adhéré au filtre et forment un tapis homogène. Le milieu qui se trouve à l'intérieur de l'insert est aspiré délicatement afin de mettre en contact les kératinocytes avec l'air ; c'est ce qu'on appelle la mise à l'interface air-liquide. Ceci permet aux kératinocytes à la surface de se différencier complètement et de pouvoir reformer les différentes couches de l'épiderme. Le milieu contenu dans le puits est aspiré et changé par un milieu de culture supplémenté en calcium (1,5 mM), vitamine C (50µg/ml) et KGF (10 ng/ml). Celui-ci est changé tous les deux jours jusqu'à obtention d'un épiderme complètement différencié à 11 jours de croissance [54].

2. Test MTT

- **Solution MTT** (Fluka-Sigma, USA, Missouri) : 0,5 mg/ml de milieu
- **Isopropanol**
- Spectrophotomètre (Molecular Devices, USA, California)

Afin d'analyser la viabilité cellulaire après traitement, un test colorimétrique MTT est utilisé. Les cellules sont incubées avec 0,5 mg/ml de MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) pendant 60 minutes à 37°C. Durant ce temps, le MTT pénètre dans les cellules et est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes pour former le formazan, un produit de couleur violette. Cette réaction d'oxydo-réduction et donc la quantité de produit formé est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Ensuite, de l'isopropanol est ajouté durant 5 min sous agitation afin de solubiliser le formazan. L'absorbance est ensuite lue avec spectrophotomètre à 540 nm.

3. Incubation à l'ionomycine

- **Ionomycine** de Calbiochem Cat407952 (USA, Massachussets), suspendu dans DMSO à 10 mM
- **Ionomycine** de Sigma-Aldrich IO634 (USA, Missouri), suspendu dans DMSO à 10 mM
- Diméthylsulfoxyde (DMSO)
- EGTA 500 mM

L'ionomycine est un ionophore sélectif qui permet de laisser passer les ions Ca²⁺ dans la cellule à travers un canal nouvellement formé afin d'augmenter la concentration intracellulaire en ions Ca²⁺. Du milieu complet EpiLife supplémenté par 1 mM de Ca²⁺ est utilisé afin d'augmenter l'effet de l'ionomycine. L'ionomycine est resuspendue dans le

DMSO à 10 mM avant utilisation. Quand les cultures de monocouches de kératinocytes sont confluentes, les cellules sont incubées avec 30 μ M d'ionomycine dans du milieu supplémenté en calcium durant 20 minutes ou 60 minutes à 37°C. Le contrôle négatif utilisé est constitué de 0,3% de DMSO dans du milieu complet supplémenté en Ca^{2+} . Un autre contrôle négatif utilisé est composé de 5 mM d'EGTA dans du milieu complet supplémenté en Ca^{2+} .

4. Incubation avec la méthyl- β -cyclodextrine.

- Méthyl- β -cyclodextrine (Sigma-Aldrich) 7,5 mM

La méthyl- β -cyclodextrine est une molécule qui permet de dépléter le cholestérol de la membrane plasmique. Quand les cultures de monocouches de kératinocytes sont confluentes, les cellules sont incubées avec 7,5 mM de méthyl- β -cyclodextrine (Sigma-Aldrich) dans du milieu complet EpiLife durant 60 minutes, suivi ou non d'une incubation dans du milieu complet EpiLife durant 60 minutes. Cette concentration a été choisie sur base des travaux de Ralph Jans [55]. Le contrôle négatif utilisé est le milieu complet EpiLife

5. Visualisation des vésicules d'ATP par la quinacrine

- Quinacrine Lot 47B-2190 (Sigma-Aldrich, USA) 2 mM

La quinacrine est une sonde fluorescente utilisée afin de visualiser les vésicules d'ATP. Après incubation avec l'ionomycine ou le DMSO, les cellules sont incubées avec du milieu complet EpiLife contenant 2 μ M de quinacrine durant 20 min à 37°C. La fluorescence de la quinacrine est observée sur des cellules vivantes en utilisant un microscope AX70 ou BX 63 (Excitation à 488 nm et émission à 510-525 nm).

6. Dosage de l'ATP extracellulaire

- Kit de dosage de l'ATP ATP determination kit #A22066 Molecular Probes (USA, Oregon)
- Luminomètre FB12 (Titertek-Berthold)

Afin de pouvoir doser l'ATP extracellulaire, un kit est utilisé selon les instructions du fournisseur. Ce kit est basé sur la réaction de la luciférase : en utilisant de l'ATP et de l'oxygène, la luciférase produit de l'oxyluciférine, de l'AMP, du pyrophosphate, du dioxyde de carbone et de la lumière.

Après incubation avec de l'ionomycine ou le DMSO, les milieux des cultures cellulaires sont prélevés. La bioluminescence détectée dans les milieux de culture produite par la luciférase est mesurée avec un luminomètre. Les concentrations d'ATP extracellulaire de chaque condition de culture sont quantifiées sur base d'une courbe d'étalonnage. Celle-ci s'étend de 0 à 1000 nM. La courbe standard est définie par une droite.

7. ELISA

- Human TNF- α DuoSet ELISA (DY210), R&D Systems (USA, Minneapolis)
- Human IL-8 DuoSet ELISA (DY208), R&D Systems (USA, Minneapolis)
- Spectrophotomètre (Molecular Devices, USA, California)

Cette technique permet de doser la quantité d'antigènes spécifiques dans les milieux récoltés de cultures de kératinocytes en monocouches. Les libérations d'IL-8 et de TNF- α ont été quantifiées par cette technique grâce à des kits obtenus chez R&D Systems (DY208 et DY210), en suivant les instructions du fabricant. Les densités optiques sont lues à 450nm avec une correction de longueur d'onde 540nm par un spectrophotomètre. Les quantifications

et calculs sont réalisés grâce au programme informatique SoftMaxPro sur base de droite d'étalonnage.

La droite d'étalonnage utilisée pour la quantification de l'IL-8 dans le milieu extracellulaire s'étend de 7,81 à 2000 pg/ml. La courbe standard est définie par une équation à quatre paramètres. La droite d'étalonnage utilisée pour la quantification du TNF- α dans le milieu extracellulaire s'étend de 4 à 1000 pg/ml. La courbe standard est définie par une équation à quatre paramètres.

8. Analyse histologique

A. Coupe en paraffine

Les tissus provenant de peau normale et d'épidermes reconstruits sont d'abord fixé par immersion dans le formol acétique (formol 4% et acide acétique glacial 1%) durant 24h. Ensuite, les échantillons sont déshydratés par trois bains successifs de 10 minutes dans le méthanol, puis trois bains de 10 minutes dans le toluol. Le toluol dissout le plastique des inserts ce qui rend facile la libération du filtre avec l'épiderme reconstruit. Afin d'optimiser l'imprégnation du tissu par la paraffine, les échantillons sont conservés durant une nuit à 60°C dans un bain de paraffine. Afin d'enrober ensuite les échantillons, ceux-ci sont placés dans une cuvette en inox remplie de paraffine liquide. Les échantillons sont disposés de manière oblique et perpendiculaire à l'axe de la cuvette afin de garantir une meilleure coupe. Ensuite, le moule est refroidi à 4°C ce qui permet à la paraffine de refroidir et de former un bloc. Celui-ci est dégrossi et coupé en sections de 6 μ m qui sont ensuite déposés sur des lames de verre. Celles-ci sont placées au four à 50° afin d'évacuer toute eau contenue dans le coupon. Ensuite, les tissus sont déparaffinés et blanchis en vue de leur coloration par immersion avec agitation dans des bains successifs de toluol (2x3min), de méthanol 100 % (2x3min), de méthanol 70% (3min) et d'eau courante (3x3min). A ce stade, les tissus peuvent être colorés par la mise en évidence des acides nucléiques du noyau par l'hémalum et des protéines du cytoplasme par l'érythrosine ; c'est une coloration bichromique. A la suite de la réhydratation du tissu, celui-ci est plongé dans des bains d'hémalum (3x3min), d'eau de ville courante (3min), d'éthanol-HCl (0,4%) (3min), d'eau de ville courante (2x3min), d'érythrosine (2x3min), d'eau de ville courante (3min), d'éthanol 70% (3min), d'isopropanol 100% (2x3min), puis de toluol 2x3min. Ensuite, les lames sont montées au DPX et peuvent être observées au microscope après 24h.

B. Coupes à congélation

Les tissus provenant de peau normale et d'épidermes reconstruits sont fixés physiquement par congélation. Des petits moules sont remplis avec un liquide cryoprotecteur, l'OCT (Tissue-Tek®, Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Pays-Bas), qui évite la formation d'aiguilles de glace. Les échantillons sont déposés à l'intérieur puis le moule est refroidi par immersion dans du méthanol à -40°C contenant une galette de glace carbonique. L'OCT durcit et l'échantillon est congelé en quelques minutes. Les échantillons ainsi fixés sont conservés à -80°C. Ensuite, les moules contenant l'échantillon sont placés sur des petites platines en aluminium à l'aide d'une goutte de cryofixateur. L'ensemble est placé dans un cryostat (Leica 1900, Leica Microsystems, GmbH, Germany) et la platine peut être fixée sur le microtome. Le bloc est dégrossi puis les coupons sont obtenus en coupant des sections de 8 μ m qui sont délicatement tirées sur les lames à l'aide d'un pinceau. L'étalement sur le verre est rendu possible grâce aux différences de température. Les lames sont ensuite amenées à température ambiante pendant 10 minutes puis sont conservées à -80°C.

Gène	Localisation	Protéine Codée	Séquence Sens	Séquence Anti-sens	Fournisseur
RPLP0	12q24.2	Protéine Ribosomale large P0 humaine	ATC-AAC-GGG-TAC- AAA-CGA-GTC	CAG-CCA-AGA- AGG	Eurogentec
TBP	6q27	Protéine de liaison à la TATA-box humaine	TCA-AAC-CCA-GAA- TTG-TTC-TCC-TTA-T	TAG-AAT-AGG-GTA- GA	Eurogentec (Sens), Sigma (Anti-sens)
FLG	1q21.3	Filagrine Humaine	GGG-CAC-TGA-AAG- GCA-AAA-AG	AAT-CTG-CAC-TAC- CA	Eurogentec (Sens), Sigma (Anti-sens)
TMEM45A	3q12.2	Protéine Transmembranaire 45A Humaine	GCC-TTA-TTT-GTG- GAG-GCC-TTT-A	TGT-CCA-GCA-TTT- C	Eurogentec
TMEM45B	11q24.3	Protéine Transmembranaire 45B Humaine	CAG-CAT-TGT-GGC- CGT-CAA	GAT-TTC-TCC-CCT- TCC-GTG-TCT	Eurogentec

Table 1 : Liste des amorces utilisées

9. Analyse de l'expression des ARN messagers

A. Extraction de l'ARN total et dosage

- **Kit high pure RNA isolation** pour ARN total (Roche)
- Matériel traité avec un agent RNase-Free (Molecular BioProducts)
- Spectrophotomètre **NANODROP 1000** (Thermo Scientific)

L'extraction de l'ARN est réalisée grâce au kti High Pure RNA Isolation. Il est important de travailler dans des conditions RNase-free. Du tampon de lyse fourni par le kit est déposé dans chaque boîte de culture afin de permettre la lyse des cellules. Ensuite, à l'aide d'un rateau le lysat cellulaire est récolté et déposé sur une colonne elle-même déposée dans un tube. Une solution de DNase I permet de dégrader l'ADN et les étapes de centrifugation et lavage permettent l'élimination des contaminants comme les sels et les protéines. L'ARN total est ensuite élué et purifié dans de l'eau RNase-free. L'ARN total est ensuite dosé à l'aide d'un spectrophotomètre NANODROP par lecture des densités optiques. La pureté de l'ADN est évaluée en mesurant la quantité de sels et protéines contenus dans l'échantillon par lecture des densités optiques et calculs réalisés par le programme informatique.

B. Transcription réverse

- **Oligo(dT) 12-18** 0,5 µg/ml (Invitrogen, 474622)
- **dNTPs** 10 mM (Invitrogen)
- **Tampon first strand** 5x (Invitrogen, Lot No 1647203)
- **DTT** 0,1 M (Invitrogen)
- **Super Script II Reverse Transcriptase** 200U/µl (Invitrogen, 1381307)
- **Eau RNase-Free**

La transcription réverse permet de synthétiser des brins d'ADN complémentaires à partir des ARN messagers extraits. Des amorces d'oligonucléotides poly dT se lient à la queue polyA des ARN messagers et permettent à la reverse transcriptase de synthétiser un brin d'ADN complémentaire en utilisant des dNTPs.

Tout d'abord, l'ARN total est dilué dans de l'eau RNase-free dans 10 µl un petit tube pour obtenir une concentration de 1000ng/µl. Un premier mélange est préparé en ajoutant à l'ARN dilué préalablement 1 µl d'oligo(dT) 0,5 µg/ml dilué 10x, 1 µl d'eau RNase-free et 1 µl de mix dNTPs 10 mM. Ce mélange obtenu est chauffé 5 minutes à 65°C afin de déplier l'ARN puis centrifugé et placé sur glace. Ensuite, un deuxième mélange est préparé avec 4 µl de tampon First Strand, 2 µl de DTT et 1 µl de reverse transcriptase SuperScript II dilué 20 x. Ces 7 µl sont ajoutés au premier mélange et le tout est incubé durant 50 minutes à 42°C pour la transcription reverse et durant 15 minutes à 70°C. L'ADN complémentaire obtenu à une concentration de 50 ng/ µl est conservé à -20°C.

C. Real-time PCR

- **SyberGreen PCR FastStart Essentiel DNA Green Master** (Roche)
- **Eau RNase-Free**
- **Amorces** (Concentration Stock : 100 µM, concentration de travail : 2,4 µM (12 µl de primer stock dilué dans 488 µl d'eau RNase-Free), concentration finale dans le mélange : 300 nM (dilution 8x) (**Table 1**))

La PCR en temps réel se base sur le principe de la PCR classique mais permet la quantification en temps réel de l'ADN total à chaque cycle d'amplification. Une sonde fluorescente, le SyberGreen, est utilisée afin de permettre le suivi de l'amplification puisque l'émission est directement proportionnelle à la concentration en ADN double brin. A la fin de

la PCR, chaque puits correspond à une valeur appelée Cq correspondant au nombre de cycles nécessaires pour dépasser un seuil précis d'émission de fluorescence. Ensuite les données sont traitées de manière informatique. La valeur Cq du gène de référence qui est exprimé de manière stable est soustraite à la valeur Cq du gène d'intérêt afin de normaliser les résultats, ce qui donne une valeur appelée dCq. Cette valeur dCq est calculée pour chaque condition biologique. Ensuite, une condition contrôle est choisie et la valeur dCq de cette condition est soustraite aux valeurs dCq des autres conditions, pour donner une valeur appelée ddCq. Ensuite, la quantification relative de l'ARNm du gène d'intérêt pour chaque condition est obtenue en mettant 2 à la puissance de la valeur ddCq. Dans le cadre de ce mémoire, les gènes de référence RPLP0 et TBP ont été choisis et une moyenne géométrique des Cq obtenus pour les deux gènes a été utilisée comme valeur Cq de gène de référence. Concrètement, un mélange par gène à analyser est préparé qui comprend par puits 10 µl de Syber Green, 2,5 µl de primer sens (Concentration finale : 300 nM) et 2,5 µl de primer anti-sens (Concentration finale : 300 nM) du gène à amplifier. Ces 15 µl sont déposés par puits. Ensuite, l'ADN est dilué 20 fois et 5 µl d'ADNc est déposé dans les puits correspondants. Des triplicats sont réalisés. Finalement, un film transparent est collé sur le dessus de la plaque afin de fermer hermétiquement la plaque, puis celle-ci est centrifugée durant 3 min à 1200 RPM. La plaque est placée ensuite dans l'appareil Real-Time PCR (LightCycler 96) et les calculs sont réalisés comme décrit ci-dessus.

10. Analyse de l'expression des protéines

A. Extraction des protéines

- **Tampon de lyse** ((0.05 M Hepes pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.1% SDS, 1% NP40, 1% Triton 1%, PIC (complete from Roche Molecular Biochemicals, dilution 1:25) et PIB (1 mM NaVO₃, 10 mM p-nitrophényl phosphate, 10 mM β-glycérophosphate et 5 mM NaF))

Les cultures cellulaires préalablement congelées à -80°C sont déposées sur glace. 150 µl de tampon de lyse sont déposés sur chaque boîte durant 15 minutes sur glace. Ensuite, racler à l'aide d'un râtelier et récupérer le lysat. Ensuite, le lysat est centrifugé durant 5 min à 5000 RPM à 4°C et le surnageant est récolté.

B. Dosage des protéines

- **Solution étalon** de BSA à 20 µg/µl
- **Réactif de Pierce** composé de Pierce 660 nm Protein Assay reagent (Thermo Scientific Lot #PD197862) et de Ionic Detergent compatibility reagent (Thermo Scientific, Lot #QA211999) à raison de 1g inhibiteur/20 ml de produit de réaction
- **Tampon de lyse** identique à celui utilisé pour l'extraction

Le dosage des protéines contenues dans chaque échantillon est réalisé grâce à un dosage colorimétrique impliquant une modification de couleur d'un composé. Ce changement est quantifié et permet l'obtention d'une valeur de concentration sur base d'une courbe de calibration.

Les échantillons sont dilués 2 fois dans l'eau distillée et déposés dans une plaque permettant la lecture au spectrophotomètre. Pour l'établissement de la courbe standard, un tube A de BSA à 4 mg/ml est préparé. Ensuite, des dilutions sériées permettent d'obtenir des concentrations à 2, 1, 0.5, et 0.25mg/ml. Après, une solution de révélation appelée réactif de Pierce est préparée et 75 µl de ce réactif sont ajoutés à 5 µl d'échantillon ou de BSA déposé dans la plaque. La réaction est incubée pendant 5 minutes et ensuite la densité optique est lue à l'aide d'un spectrophotomètre à 660 nm.

C. Electrophorèse, Western blotting et révélation

- **Running gel :**
 - o Solution Acrylamide/bisacrylamide 40% du volume total (Sigma)
 - o TrisHcl 1,5 M, pH 8,8 25% du volume total (Merck)
 - o SDS 10% 1% du volume total (Sigma)
 - o Ammonium Persulfate (APS) 1% du volume total (Sigma)
 - o TEMED 0,1% du volume total (Merck)
 - o Eau 31% du volume total
- **Stacking gel :**
 - o Solution Acrylamide/bisacrylamide 13% du volume total (Sigma)
 - o TrisHcl 0,5 M, pH 6,8 25% du volume total (Merck)
 - o SDS 10% 1% du volume total (Sigma)
 - o Ammonium Persulfate (APS) 0,5% du volume total (Sigma)
 - o TEMED 0,15% du volume total (Merck)
 - o Eau 60% du volume total
- **Tampon de charge :** Bleu de bromophénol 5x concentré
- **Tampon d'électrophorèse :** 24,76 mM de TrisBase (Acros Organics), 192 mM de Glycine (Fischer Scientific), 3,5 mM de SDS
- **Tampon de transfert :** 24,76 mM de TrisBase (Acros Organics), 192 mM de Glycine (Fischer Scientific), 20% de méthanol (Fischer Chemical)
- **Echelle de poids moléculaire** PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific Lot #00289411)
- **Membrane :** PVDF Transfer Membrane (Thermo Scientific Lot #PJ1905381A)
- **Solution de rinçage :** PBS (2.7 mM de KCl, 1.47 mM de KH₂PO₄, 8.15 mM de Na₂HPO₄.2H₂O, 137 mM de NaCl à pH 7,4) Tween 20 à 0,1% (Fischer Scientific Lot 145162)
- **Solution de saturation :** PBS (2.7 mM de KCl, 1.47 mM de KH₂PO₄, 8.15 mM de Na₂HPO₄.2H₂O, 137 mM de NaCl à pH 7,4) Tween 20 à 0,1% (Fischer Scientific Lot 145162), 5% de poudre de lait gloria, Nestlé
- **Solution de révélation :** BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) Starting Solution B (10 µl) et Luminescence substrate solution A (1 ml)(Roche)

Cette technique permet de détecter des protéines grâce à l'utilisation d'un anticorps primaire et d'un anticorps secondaire lié à un système de visualisation après électrophorèse et transfert sur membrane. Tout d'abord, l'électrophorèse permet de faire migrer les protéines chargées à travers un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes sous l'influence d'un champ électrique. Ceci permet de les séparer selon leurs poids. Le gel d'électrophorèse est composé de deux parties : le stacking gel qui permet de concentrer les protéines avant leur passage dans le running gel, qui permet la séparation des protéines à proprement parler. Ce gel est coulé et formé. L'APS et le Temed servent de catalyseurs à la polymérisation du gel.

Le running gel est donc d'abord préparé, puis ensuite le stacking gel est préparé et un peigne est déposé avant sa polymérisation afin de former les puits nécessaires au dépôt des protéines. Ensuite, les gels sont placés dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon d'électrophorèse.

Les échantillons sont dilués dans l'eau afin de leur donner une concentration uniforme. Du tampon de charge est ajouté à chaque échantillon afin d'obtenir un volume total de 25 µl et

Type	Espèce	Spécificité	Firme	Numéro de produit	Dilution(s) utilisées(s)
Primaire	Lapin	Anti protéine TM 45A	Sigma	HPA024082-100UL	1/100
Primaire	Lapin	Anti protéine TM 45A	Santa Cruz	sc-100196	1/100
Primaire	Lapin	Anti protéine TM 45B	Sigma	HPA015878-100UL	1/50
Primaire	Souris	Anti Filaggrine	NeoMarkers	Lot 449P101	1/100
Primaire	Souris	Anti-GM 130	BD Biosciences	610822	1/100
Primaire	Souris	Anti-Golgi 97	Molecular Probes	#A21270	1/100
Primaire	Souris	Anti-Lamp1 H4A3	DSHB	H4A3	1/50 et 1/100
Secondaire	Chèvre	Anti-Lapin vert	Life Technologies	Alexa Fluor 488 nm #A11008	1/1000
Secondaire	Chèvre	Anti-souris vert	Life Technologies	Alexa Fluor 488 nm #A11001	1/1000
Secondaire	Chèvre	Anti-souris rouge	Life Technologies	Alexa Fluor 568 nm #A11004	1/1000

Table 2 : Liste des anticorps utilisés

ceux-ci sont soit bouillis à 100°C durant 5 minutes soit chauffés durant 3 minutes à 37°C afin d'observer une éventuelle différence [52]. Ensuite, le gel est chargé avec 20 µl d'échantillon par puits et un puits est chargé avec 4 µl de ladder, qui permet une échelle de poids moléculaire. L'électrophorèse est lancée pendant 1h30 à 120V.

La deuxième étape après l'électrophorèse est l'étape de transfert sur membrane. Celui-ci est réalisé sous l'action d'un champ électrique. Le gel est donc équilibré dans du tampon de transfert froid.

La membrane est plongée dans un bain de méthanol avant d'être plongée dans un bain de tampon de transfert. Un « sandwich » est réalisé en posant le gel contenant les protéines contre la membrane, le tout posé entre deux papiers Whatman et deux éponges trempés dans du tampon de transfert. Le transfert est réalisé dans une cuve de transfert au frigo pendant 2h à 120V.

La troisième étape consiste en la révélation des protéines d'intérêt. Pour ce faire, la membrane contenant les protéines est saturée durant 1h dans une solution de saturation. Ensuite, cette solution est retirée et l'anticorps primaire dilué dans la solution de saturation est ajouté sous agitation à 4° durant une nuit. Le lendemain, la membrane est rincée 3x4 minutes dans une solution de rinçage et incubée durant 1h avec l'anticorps secondaire dilué dans la solution de saturation, couplé à une enzyme HRP (Horse Radish Peroxydase). Finalement, une solution de révélation est ajoutée et la détection des protéines est réalisée par ImageQuant. Le marqueur de charge RPL13a est utilisé afin de pouvoir vérifier l'homogénéité des quantités de protéines contenues dans chaque puits.

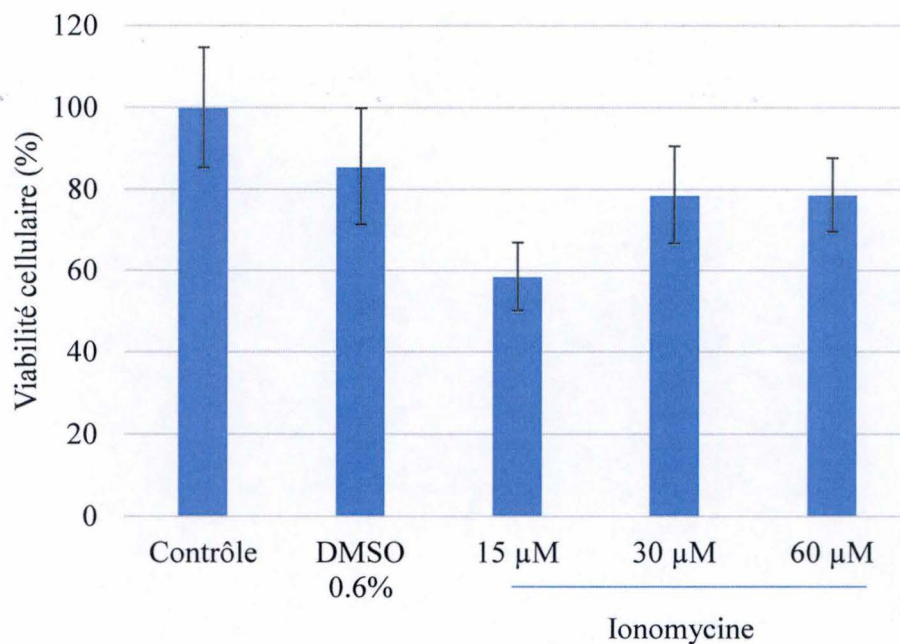
11. Marquages immunofluorescents

- **PBS-PFA 4%** : contient du paraformaldéhyde (PFA)(No 30525-89-4 Merck KGaA) dissout dans du PBS, chauffé à 70°C et dont le pH est ajusté à 7.2 avec 10 M NaOH. Le PBS-PFA 4% peut être supplémenté avec 1 mM de CaCl₂ et 0.5 mM de MgCl₂ pour donner du PBS-CaCl₂-PFA 4% quand nécessaire.
- **Méthanol 80%/acétone 20%**
- **PBS** : 2.7 mM de KCl, 1.47 mM de KH₂PO₄, 8.15 mM de Na₂HPO₄.2H₂O, 137 mM de NaCl à pH 7,4. Cette solution peut être supplémentée avec 1 mM de CaCl₂ et 0.5 mM de MgCl₂ pour donner du PBS-CaCl₂ quand nécessaire.
- **Glycine 0,1 M** (Fisher Scientific)
- **Triton X100 (Fischer Scientific, BP 151-100)**
- **BSA (GE Healthcare, K41-017)**
- **Anticorps primaires et secondaires (Table 2)**

Le marquage immunofluorescent est basé sur le principe de reconnaissance d'une protéine particulière par un anticorps dit primaire. Ensuite, un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome permet d'observer la localisation de ces protéines grâce à un microscope à fluorescence. Différentes optimisations ont été utilisées afin de mettre au point la détection. Des cultures de cellules sur couvre-objets, des échantillons de peau normale ainsi que des épidermes humains reconstruits ont été utilisés. Les couvre-objets sont fixés pendant 10 min avec du méthanol 80%/acétone 20% à -20°C ou dans du PBS-PFA 4% supplémenté ou non avec du calcium et du magnésium durant 15 minutes à température ambiante. Les coupes en paraffine ou à congélation de peau humaine et d'épiderme humain reconstruit sont fixées durant 15 minutes dans du PBS-PFA4%. Le tout est rincé avec du PBS éventuellement supplémenté en calcium et magnésium et ensuite incubé avec de la glycine 0,1 M 3x2 minutes si fixé par le PFA ce qui permet d'éliminer les aldéhydes encore fonctionnels. Après rinçage, soit il n'y a pas perméabilisation soit il y a perméabilisation des membranes cellulaires en

incubant les couvre-objets dans du PBS-BSA 0,2%-Triton X100 0,02% supplémenté ou non par du calcium et du magnésium durant 10 min. Ensuite, ils sont incubés dans du PBS-BSA supplémenté ou non en calcium et magnésium durant 30 minutes afin de diminuer l'aspécificité du marquage. Les coupes à congélation et paraffine sont incubées dans du PBS-BSA 0,2%-Triton X100 0,02% supplémenté ou non par du calcium et du magnésium durant 30 minutes. Ensuite, les cellules sur couvre-objets sont incubées avec l'anticorps primaire (voir liste) dilué dans du PBS-BSA ou dans du PBS-BSA Triton supplémenté ou non en calcium et magnésium durant 2 heures à température ambiante ou durant toute la nuit à 4°C. L'anticorps primaire est également déposé sur les coupes en paraffine et congélation durant toute la nuit à 4°C. Ensuite, l'anticorps secondaire dilué dans du PBS-BSA ou dans du PBS-BSA Triton supplémenté ou non en calcium et magnésium durant 1 heure à température ambiante, dans l'obscurité. Après rinçage, les noyaux sont marqués grâce au Hoechst 33258 (Life Technologies) dilué dans du PBS-BSA ou dans du PBS-BSA Triton supplémenté ou non en calcium et magnésium. Après un dernier rinçage, les coupes et couvre-objets sont montés grâce à du mowiol. Les marquages sont donc ensuite analysés grâce à un microscope à fluorescence AX70 ou BX63 (Olympus), ou un microscope confocal (Leica SP5).

A



B

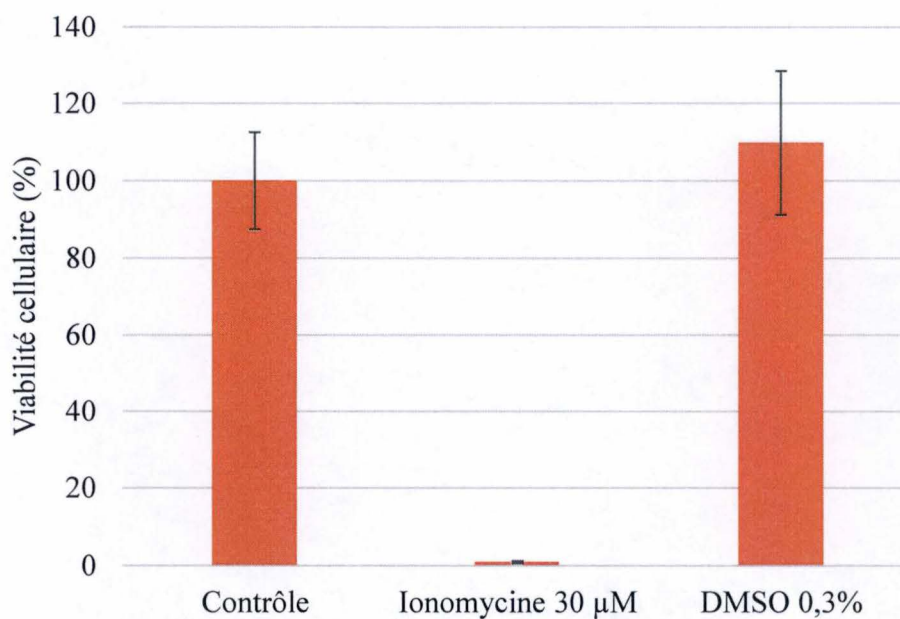


Figure 16 : Viabilité cellulaire après incubation avec l'ionomycine

Des cultures de kératinocytes confluentes sont incubées durant 20 minutes avec du milieu complet supplémenté avec du Ca^{2+} 1 mM et de l'ionomycine. Du milieu complet supplémenté avec 1 mM Ca^{2+} et du DMSO est utilisé en tant que contrôle négatif. Ensuite, un test MTT est réalisé directement (A) ou après 24h de récupération (B). La viabilité des cellules incubées avec du milieu complet supplémenté avec du Ca^{2+} 1 mM est fixée à 100%. Triplet d'une expérience.

Résultats

1. Première partie : Rôle potentiel de TMEM45A dans l'exocytose

La première partie du mémoire consistait en l'étude du rôle potentiel de TMEM45A dans l'exocytose des kératinocytes. Effectivement, des récents résultats d'Auréli Hayez dans notre laboratoire ont montré que la protéine transmembranaire codée par TMEM45A était partiellement localisée au niveau du trans-golgi et du réseau trans-golgien [45]. Or, le trans-golgi et le TGN sont responsables du tri des protéines sécrétées et jouent un rôle dans l'exocytose de certaines protéines [9]. L'objectif était donc de mettre au point des outils qui permettent d'analyser et d'observer l'exocytose des kératinocytes, puis d'observer les éventuelles conséquences de l'invalidation de TMEM45A sur l'exocytose des kératinocytes.

A. Toxicité de l'ionomycine

Afin de mettre au point ces outils permettant d'analyser l'exocytose, une molécule particulière appelée ionomycine est utilisée afin de provoquer un influx d'ions Ca^{2+} dans la cellule et de provoquer l'exocytose. Nous nous sommes basés sur les travaux de Ralph Jans qui ont montré qu'une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} induite par l'ionomycine avait pour conséquence l'exocytose de lysosomes [24]. Des kératinocytes humains épidermiques sont cultivés jusqu'à un stade de confluence, stade où les kératinocytes recouvrent l'entièreté de la boîte de culture et sont prêts à se différencier.

Puisqu'on utilise l'ionomycine pour provoquer l'exocytose, il est intéressant de savoir si l'ionomycine est toxique pour les cellules. Pour ce faire, des kératinocytes sont cultivés jusqu'à confluence et incubés durant 20 minutes avec différentes concentrations d'ionomycine (15 μM , 30 μM et 60 μM) dans un milieu supplémenté avec du Ca^{2+} 1 mM afin d'augmenter la capacité des cellules à exociter leur contenu. Etant donné que l'ionomycine est solubilisée dans le DMSO, des kératinocytes sont également incubés dans du milieu contenant 0,3% de DMSO afin d'avoir un contrôle négatif à concentration équivalente de DMSO.

Après avoir effectué un test MTT, il est remarqué que l'ionomycine à 30 μM et 60 μM n'affecte pas la viabilité cellulaire de manière significative. De manière surprenante, une mesure plus basse de la viabilité cellulaire est observée lorsque les cellules sont incubées avec une concentration de 15 μM d'ionomycine (**Fig 16A**).

Un autre test a été réalisé afin d'évaluer les effets à long terme de l'incubation des cellules avec l'ionomycine. Des kératinocytes sont incubés durant 20 minutes dans un milieu supplémenté avec du Ca^{2+} 1 mM et de l'ionomycine à 30 μM ou dans un milieu supplémenté avec du Ca^{2+} 1 mM et 0,3% de DMSO. Ensuite, les kératinocytes sont incubés pendant 24h dans du milieu de culture. Dans ce cas, les cellules ne survivent pas après un traitement à l'ionomycine (**Fig 16B**).

Ces résultats montrent que l'ionomycine n'affecte pas immédiatement la viabilité cellulaire, mais que les cellules ne peuvent récupérer de ce traitement. L'ionomycine a donc été utilisée dans nos expériences suivantes afin d'étudier l'exocytose, directement après incubation. En accord avec d'autres études, une concentration de 30 μM d'ionomycine a dès lors été utilisée durant 20 minutes dans toutes les expériences décrites ci-dessous [24].

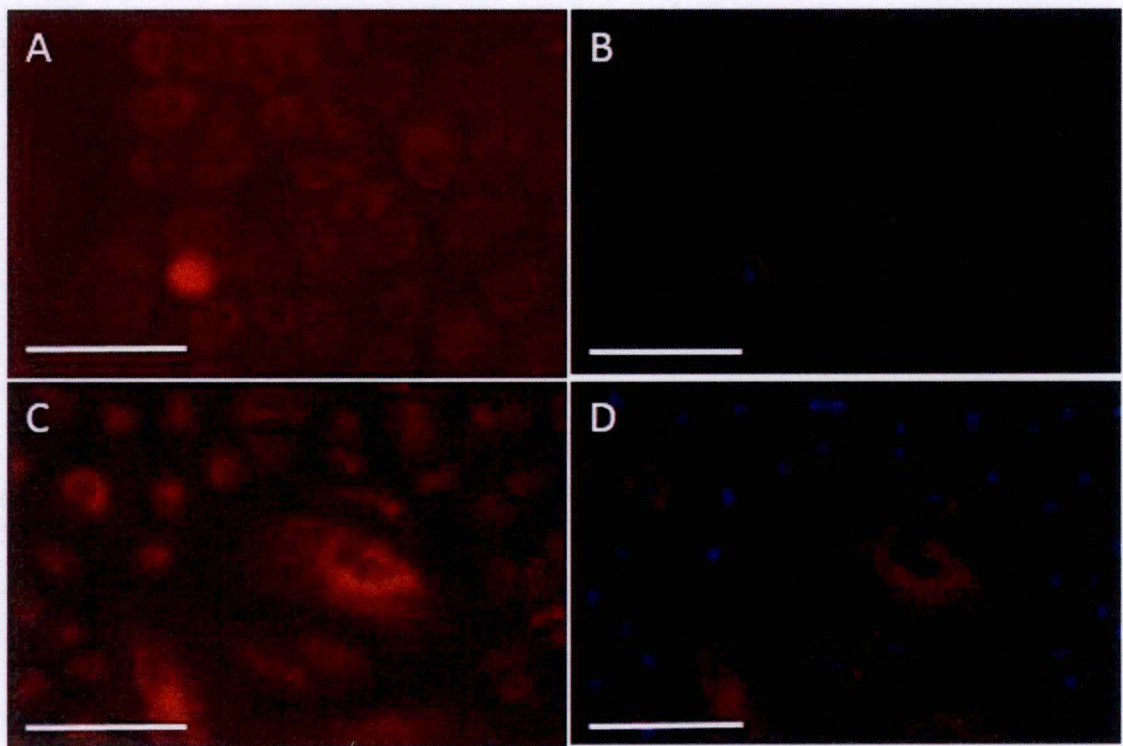


Figure 17 : Marquage immunofluorescent de LAMP1 en réponse à l'incubation avec l'ionomycine

Des cultures de kératinocytes confluentes sont incubées durant 20 minutes avec du milieu complet supplémenté avec du Ca^{2+} 1 mM et du DMSO 0.3% (A,B) ou de l'ionomycine 30 μM (C,D). Les cellules sont perméabilisées avec du Triton 0.02%. Les noyaux sont marqués avec du Hoechst 33258. Les cellules sont analysées grâce à un microscope à fluorescence Olympus AX70. Barres d'échelle : 50 μm .

B. Redistribution de LAMP1 en surface

Un des outils à mettre au point pour étudier le rôle de TMEM45A dans l'exocytose était la visualisation de la redistribution de LAMP1, une protéine transmembranaire lysosomale, vers la surface cellulaire, autrement dit dans membrane plasmique. Effectivement, les études de Ralph Jans ont montré que LAMP1 peut être détecté à la surface cellulaire des kératinocytes incubées avec l'ionomycine [24]. Les membranes lysosomales atteignent la membrane plasmique au cours de l'exocytose des lysosomes induite par l'ionomycine. L'objectif était donc de visualiser les effets de l'ionomycine sur la localisation cellulaire de LAMP1 pour confirmer l'exocytose.

Une différence devrait être observée lorsque les cellules sont perméabilisées ou non avant la détection de LAMP1. Sans ionomycine, lorsque les cellules sont perméabilisées, un signal cytoplasmique périnucléaire de LAMP1 est observé, correspondant vraisemblablement à sa localisation lysosomale. Au contraire, lorsque les cellules ne sont pas perméabilisées, il n'y a pas de signal observé puisque l'anticorps est incapable de rentrer à l'intérieur des cellules dans ces conditions. Si l'ionomycine est utilisée et que les cellules ne sont pas perméabilisées, l'exocytose des lysosomes induite par l'ionomycine redistribue LAMP1 en membrane plasmique, et un signal est donc observé à la membrane plasmique [24].

Plusieurs paramètres ont été testés afin d'optimiser la détection de LAMP1. Une première détection de LAMP1 par immunofluorescence a été réalisée après incubation de cultures de kératinocytes à confluence. Les contrôles utilisés sont des kératinocytes incubés dans un milieu supplémenté avec du Ca^{2+} 1 mM et du DMSO 0,3%. Les cellules sont perméabilisées avant l'incubation avec l'anticorps primaire. Un faible signal périnucléaire correspond à ce qu'on attend dans le contrôle et est observé indépendamment de la condition. Il est impossible de différencier les signaux observés après incubation à l'ionomycine ou incubation avec le DMSO, et donc impossible de confirmer une exocytose des lysosomes (**Fig 17**).

De ce fait, chaque paramètre du marquage immunofluorescent a été vérifié. Le fixateur initialement utilisé étant le PBS-PFA 4%, du méthanol/acétone a été utilisé afin de générer un meilleur signal, mais les résultats demeuraient les mêmes : un signal périnucléaire est observé peu importe la condition (données non montrées).

Ensuite, le fixateur PBS-PFA4% a été utilisé avec un autre anticorps secondaire (Alexa Fluor 488 nm) choisi puisqu'il est possible d'observer un meilleur signal dans le vert par rapport au signal observé dans le rouge. Du PBS supplémenté par du Ca^{2+} 1 mM a été également utilisé. Une détection par immunofluorescence de LAMP1 a été réalisée et cette détection est comparée lorsque les cellules sont perméabilisées ou non (**Fig 18**).

Une différence entre les deux paramètres est observée : lorsque les cellules sont perméabilisées, un signal périnucléaire est observé, quelle que soit la condition. Par contre, une différence dans la localisation de LAMP1 dans les cellules non perméabilisées et incubées avec l'ionomycine est remarquée : un signal apparaît au niveau de la membrane plasmique.

Afin d'améliorer la qualité du marquage, deux fixateurs différents ont été utilisés et comparés : le PBS-PFA 4% jusqu'ici utilisé, et le PBS-PFA 4% supplémenté en ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . Le Ca^{2+} permet de stabiliser les protéines transmembranaires. Les cellules n'ont pas été perméabilisées. Il en résulte que le signal ne varie pas, hormis une légère différence dans l'intensité de fluorescence (données non montrées).

Ces résultats indiquent que l'exocytose a eu lieu. Dans les cellules non-perméabilisées, un signal très faible est observé dans la condition contrôle, pas aussi intense que dans les cellules perméabilisées. Une immunoréactivité plus intense en membrane de LAMP1 est détectée dans

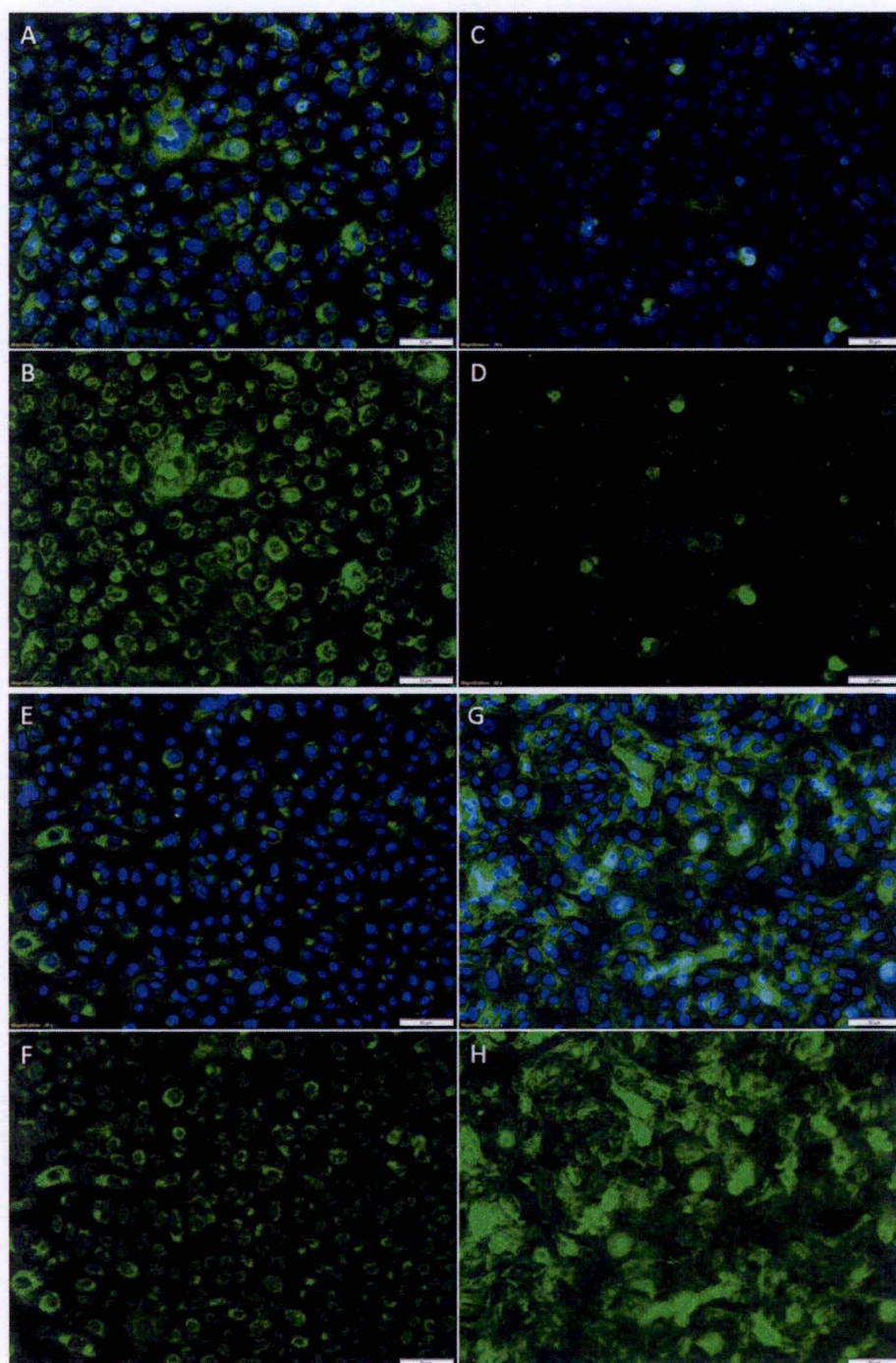


Figure 18 : Marquage immunofluorescent de LAMP1 sur des kératinocytes en réponse à l'incubation avec l'ionomycine

Des cultures confluentes de kératinocytes sont incubées avec du milieu complet supplémenté avec Ca^{2+} 1 mM et du DMSO 0.3% (A,B,C,D) ou de l'ionomycine 30 μM (E,F,G,H). Les cellules sont perméabilisées avec du Triton 0.02% (A,B,E,F) ou non perméabilisées (C,D,G,H). Les cellules incubées dans du milieu complet supplémenté avec du Ca^{2+} 1 mM et du DMSO 0.3% sont utilisées en tant que contrôle négatif. Les noyaux sont marqués par du Hoechst 33258. Les cellules sont analysées grâce à un microscope à fluorescence Olympus BX63. Barres d'échelle : 50 μm

les cellules incubées avec l'ionomycine, indiquant que LAMP1 est bien redistribué et que l'ionomycine induit l'exocytose. Cependant, le marquage des membranes cellulaires n'est pas distinct, et il a été impossible d'obtenir un signal correct et distinct.

C. Exocytose d'ATP

a. Visualisation des vésicules d'ATP

Afin de vérifier si l'ionomycine produit l'effet escompté sur l'exocytose d'ATP vésiculaire, une détection fluorescente par la quinacrine a été réalisée. Celle-ci permet la visualisation des vésicules d'ATP. En réponse à l'incubation avec l'ionomycine, les vésicules d'ATP sont exocytées, comme l'ont montré de récentes études [18].

Des cultures confluentes de kératinocytes sont incubées avec du milieu complet contenant 1 mM de Ca^{2+} et 30 μM d'ionomycine, et comparées à des cultures incubées avec du milieu complet contenant 1 mM de Ca^{2+} et 0,3% de DMSO en tant que contrôle négatif. Toutes les expériences sont réalisées avec un milieu contenant une concentration élevée en Ca^{2+} , afin d'augmenter l'exocytose [24]. Ensuite, les cellules sont incubées avec 2 μM de quinacrine contenue dans un milieu supplémenté avec du Ca^{2+} 1 mM (**Fig 19**).

Dans la condition contrôle, le signal montre un aspect granuleux, qui correspond aux vésicules d'ATP. Un signal granuleux mais moins intense est remarqué lorsque les kératinocytes sont incubés avec le DMSO, ce qui suggère un effet léger du DMSO sur les vésicules d'ATP. Par contre, après incubation avec l'ionomycine, le signal cytoplasmique disparaît, laissant place à un signal faible au niveau du noyau. Ce marquage nucléaire peut être dû au fait que la quinacrine est par ailleurs capable de marquer les acides nucléiques. Ce résultat confirme que l'ionomycine induit effectivement l'exocytose de vésicules d'ATP.

De plus, plusieurs lots d'ionomycine ont été testés, provenant de différents fournisseurs (Sigma et Calbiochem). Afin de confirmer que chaque lot était capable ou non d'induire l'exocytose, la même expérience a été répétée en utilisant ces différents lots.

En conclusion, nos résultats nous ont appris que la visualisation des vésicules d'ATP grâce à la quinacrine, après incubation des kératinocytes avec l'ionomycine, représente un outil utilisable pour étudier cette forme d'exocytose dans ces cellules.

b. Mesure de l'ATP extracellulaire

Afin de confirmer l'exocytose d'ATP après incubation avec l'ionomycine, la concentration en ATP extracellulaire présent dans les milieux de cultures prélevés a été mesurée et quantifiée. Une augmentation de cette concentration d'ATP extracellulaire est attendue après incubation avec l'ionomycine, ce qui prouverait que l'exocytose d'ATP a bien eu lieu.

Des cultures confluentes de kératinocytes sont incubées avec du milieu complet contenant 1 mM de Ca^{2+} et 30 μM d'ionomycine durant 20 minutes et 60 minutes. Des kératinocytes sont également incubés avec du milieu complet contenant 1 mM de Ca^{2+} et 0,3% de DMSO en tant que contrôle négatif. Un autre contrôle négatif est également réalisé, en incubant les kératinocytes avec du milieu complet contenant 1 mM de Ca^{2+} , de l'ionomycine 30 μM et 5 mM d'EGTA. L'EGTA est un agent chélatant le Ca^{2+} , ce qui empêche cet ion d'induire l'exocytose. Ensuite, les milieux des cultures sont prélevés et une mesure de l'ATP extracellulaire est effectuée.

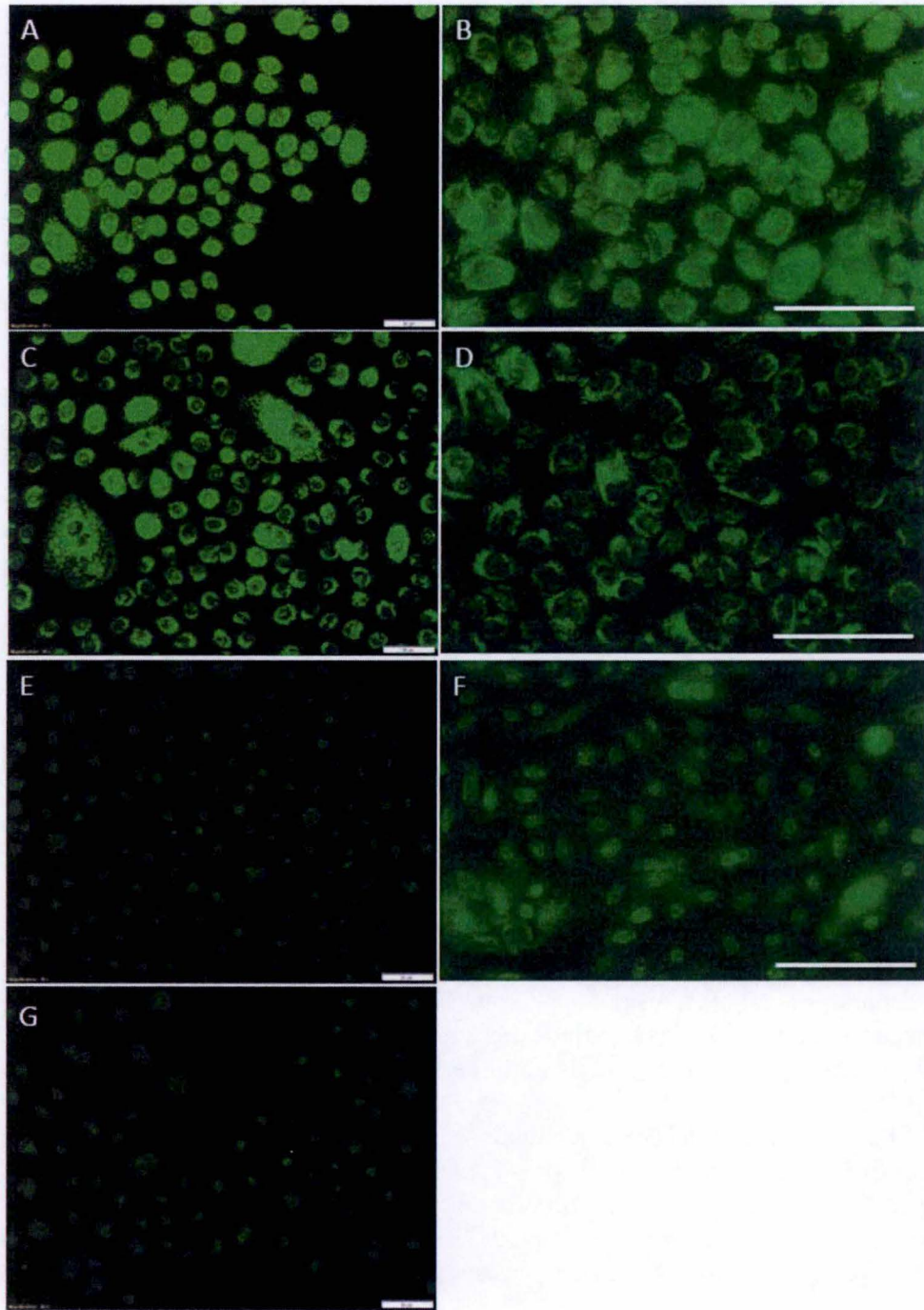


Figure 19 : Visualisation des vésicules d'ATP par la quinacrine après incubations avec différents lots d'ionomycine

Des cultures confluentes de kératinocytes sont incubées durant 20 minutes avec du milieu complet supplémenté avec Ca^{2+} 1 mM (A,B) seulement ; du milieu complet supplémenté avec du Ca^{2+} 1 mM et du DMSO 0.3% (C,D), de l'ionomycine 30 μM (Calbiochem)(E,F) ou de l'ionomycine 30 μM (Sigma)(G). Les cellules incubées dans du milieu complet supplémenté avec Ca^{2+} 1 mM contenant ou non du DMSO 0.3% sont utilisées en tant que contrôle négatif. Les cellules sont analysées grâce à un microscope à fluorescence Olympus AX 70 (gauche) and Olympus BX63 (droit). Barres d'échelle : 50 μm

Les résultats obtenus sont tels qu'attendus : une concentration en ATP extracellulaire plus élevée est retrouvée dans le milieu collecté à partir de cultures de kératinocytes incubés avec l'ionomycine, après 20 ou 60 minutes. On peut remarquer qu'une concentration basale d'ATP est retrouvée dans les milieux prélevés, cependant les valeurs semblent plus élevées que celles mentionnées dans la littérature : des valeurs avoisinant les 40 nM d'ATP extracellulaire sont retrouvées après mesure de l'ATP extracellulaire dans les milieux, tandis que d'autres recherches mentionnent un niveau basal d'ATP extracellulaire dans le milieu avoisinant les 10 nM [17]. Aussi, on ne retrouve pas l'effet du DMSO observé lors du marquage des vésicules d'ATP par la quinacrine (**Fig 20**).

Ces résultats indiquent que l'exocytose d'ATP a eu lieu. La mesure de l'ATP extracellulaire constitue donc un bon outil afin d'étudier l'exocytose et les fonctions potentielles de TMEM45A dans celle-ci.

Cependant, l'expérience n'est pas reproductible et nous n'avons pas pu confirmer ce résultat.

D. Réponse inflammatoire

Des études ont montré que les kératinocytes sont impliqués dans la réponse inflammatoire et sont capables de libérer du TNF- α ou de l'interleukine-8 (IL-8) ainsi que d'autres cytokines [26, 28, 31]. Etant donné que le TNF- α est également localisé dans le réseau trans-golgien et qu'il constitue la première cytokine libérée en cas de réaction inflammatoire [31], nous avons réalisé des dosages du TNF- α dans le milieu de culture. Un dosage de l'IL-8 a également été réalisé dès lors que l'IL-8 est sécrétée de manière vésiculaire. Ces dosages ont été réalisés afin d'étudier les impacts de TMEM45A éventuels sur la sécrétion de TNF- α et d'IL-8 dans des kératinocytes invalidés.

Des cultures confluentes de kératinocytes sont incubées avec du milieu complet contenant 1 mM de Ca^{2+} et 30 μM d'ionomycine durant 20 minutes et 60 minutes. Des kératinocytes sont incubés avec du milieu complet contenant 1 mM de Ca^{2+} et 0,3% de DMSO en tant que contrôle négatif. Un autre contrôle négatif est également réalisé, en incubant les kératinocytes avec du milieu complet contenant 1 mM de Ca^{2+} , de l'ionomycine 30 μM et 5 mM d'EGTA. Ensuite, les milieux des cultures sont prélevés et une mesure de la libération de TNF- α et d'IL-8 est réalisée par ELISA.

Le dosage du TNF- α révèle l'ensemble des valeurs obtenues en dessous du seuil de détection. Ceci indique donc que, quelle que soit la condition utilisée, il n'y a pas de libération de TNF- α et donc il est impossible d'étudier l'exocytose à l'aide de cette approche.

Les résultats obtenus après le dosage de l'IL-8 ne permettent pas non plus de pouvoir tirer des conclusions et d'étudier le rôle potentiel de TMEM45A dans l'exocytose : il n'y a pas de différence entre la quantité d'IL-8 libérée par les kératinocytes incubés avec l'ionomycine et les kératinocytes incubés dans les conditions contrôle. Cependant, des kératinocytes ont également été incubés avec la méthyl- β -cyclodextrine en tant que contrôle positif, puisque Conny Mathay a montré qu'il existe une sur-expression du TNF- α ainsi que de l'IL-8 après déplétion du cholestérol par la méthyl- β -cyclodextrine [29]. Une légère augmentation de la libération d'IL-8 est observée lorsqu'on incube les kératinocytes avec la méthyl- β -cyclodextrine (**Fig 21**).

En conclusion de cette première partie, nous n'avons pas réussi à mettre au point entièrement des outils permettant d'étudier l'exocytose et le rôle potentiel de TMEM45A dans celle-ci. La mise en évidence des vésicules d'ATP par la quinacrine est mise au point, mais la mise au point de la mesure de l'ATP extracellulaire et de l'observation de la redistribution de LAMP1 en

Effet d'une incubation avec l'ionomycine durant 20 et 60 minutes sur la libération d'ATP

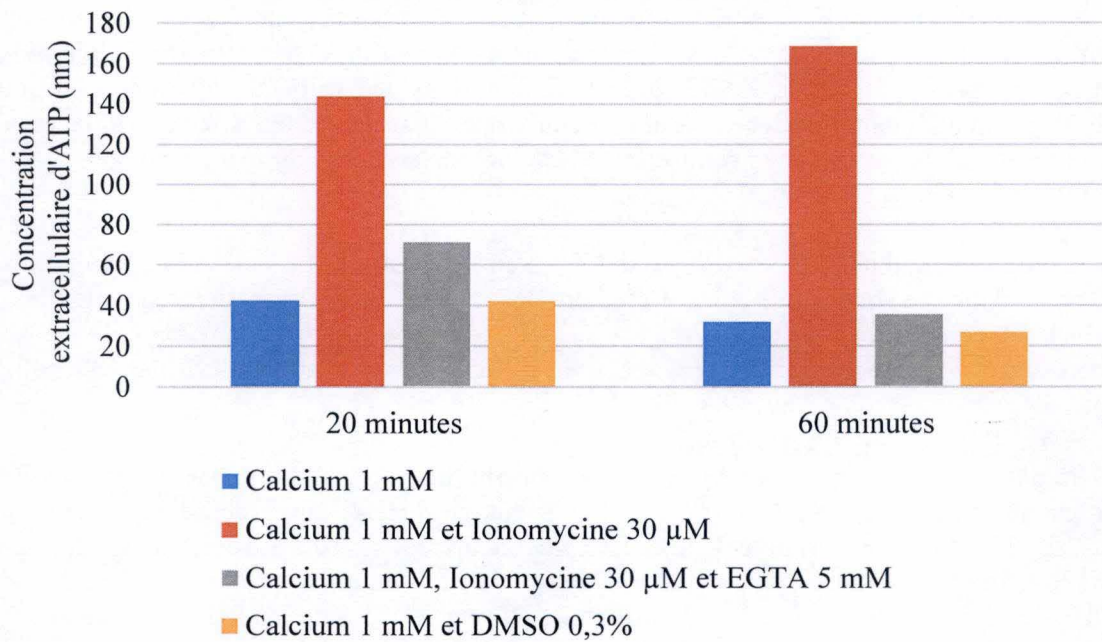


Figure 20 : Effet de l'incubation avec l'ionomycine sur la libération de l'ATP dans le milieu

Des cultures confluentes de kératinocytes sont incubées durant 20 min avec du milieu complet supplémenté avec du Ca^{2+} 1 mM seulement, avec du DMSO 0,3% ou de l'ionomycine 30 μ M. Ensuite, les milieux sont prélevés et la concentration en ATP est mesurée. Deux puits dans deux expériences indépendantes sont mesurés.

surface nécessitent encore des ajustements. Finalement, l'étude de la réponse inflammatoire se révèle inadéquate pour évaluer une éventuelle exocytose.

2. Deuxième partie : TMEM45B

Les résultats récents d'Aurélié Hayez dans notre laboratoire ont suscité plusieurs questions. Effectivement, en invalidant TMEM45A dans plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo*, il n'y a pas de conséquence apparente et cette invalidation n'empêche pas l'épiderme de se former de manière normale.

Puisque l'on n'observe pas de phénotype particulier lors de l'invalidation de TMEM45A, des mécanismes de compensation de cette invalidation pourraient se mettre en place. L'hypothèse était d'étudier une éventuelle compensation de cette invalidation par un autre membre de la famille TMEM45, en l'occurrence TMEM45B. Si de plus en plus d'infos sont disponibles à propos de TMEM45A, l'expression de TMEM45B et la localisation de la protéine transmembranaire codée par TMEM45B restent inconnus ou dans tous les cas mal connus. L'objectif était donc dans un premier temps d'étudier l'expression de TMEM45B et la régulation éventuelle de son expression dans des cultures de kératinocytes en monocouche, des épidermes reconstruits et des peaux normales humaines. Pour ce faire, des marquages immunofluorescents ont été réalisés, ainsi qu'une analyse protéique par Western blot et une analyse des transcrits par PCR quantitative après transcription réverse.

A. Analyse de l'expression des ARN messagers

Dans un premier temps, une analyse de l'expression de TMEM45B a été réalisée afin d'étudier son expression dans des cultures de kératinocytes. Des kératinocytes sont donc mis en culture puis congelés à différents moments de croissance: sous-confluence (C-2, stade où les cellules sont encore en prolifération), confluence (C, stade où la prolifération s'arrête et laisse place à la différenciation), et post-confluence (C+2 et C+4, stade durant lesquels les cellules deviennent différenciées, se stratifient et où des marqueurs de différenciation tardifs sont exprimés). Ensuite, les kératinocytes sont lysés et les ARN totaux sont extraits. Une transcription réverse permet d'obtenir des ADN complémentaires, puis une PCR quantitative permet d'étudier leur abondance lors de ces différents stades de confluence, pour des transcrits différents, afin de les comparer entre les différentes conditions étudiées. Les expressions de trois gènes ont été étudiées : le gène codant pour la filaggrine en tant que marqueur tardif de différenciation, TMEM45B, et TMEM45A enfin puisque son profil d'expression a déjà été étudié [45]. Les amorces utilisées pour la PCR quantitative sont validées pour chaque gène étudié.

Les résultats obtenus pour TMEM45A confirment les résultats obtenus par Aurélié Hayez : l'expression de TMEM45A augmente avec la différenciation, atteignant dans nos résultats un niveau maximum 4 jours après la confluence (Cq compris entre 22 et 26) (**Fig 22**). Par rapport au stade C-2, choisi comme niveau de référence, il apparaît que l'expression relative de l'ARNm de TMEM45A est 4,9 fois plus élevée à confluence, 22,5 fois à C+2 et 45,8 fois plus élevée à C+4 par comparaison avec l'expression à sous-confluence. L'induction est statistiquement significative à confluence (C) (* $P < 0,05$) et très hautement significative à C+2 et C+4 (***) ($P < 0,001$) (ANOVA1). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Aurélié Hayez.

Les résultats obtenus pour TMEM45B suivent le même profil que ceux obtenus pour TMEM45A, c'est-à-dire une augmentation de l'expression de TMEM45B avec la durée des cultures et donc la différenciation, atteignant également dans nos résultats un niveau maximum 4 jours après la confluence (Cq compris entre 22 et 26) (**Fig 22**). Par rapport au stade C-2,

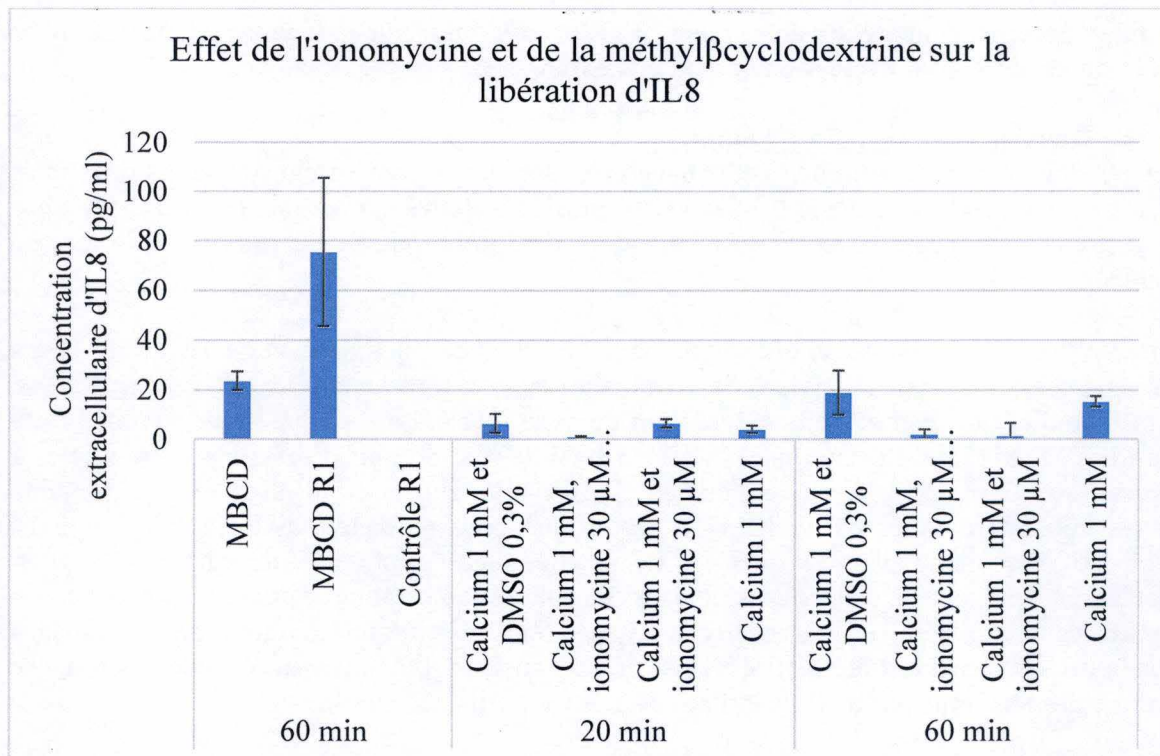


Figure 21 : Effet de l'incubation avec l'ionomycine et la méthyl- β -cyclodextrine sur la libération d'IL8

Des cultures confluentes de kératinocytes sont incubées durant 20 et 60 minutes avec du milieu complet supplémenté avec du Ca^{2+} 1 mM seulement, avec du DMSO 0,3% ou de l'ionomycine 30 μM ; ou avec du milieu complet contenant de la méthyl- β -cyclodextrine 7,5 mM durant une heure. Les milieux sont prélevés directement après incubation, excepté pour la condition contrôle et une condition méthyl- β -cyclodextrine après une heure de récupération suivant l'incubation avec la méthyl- β -cyclodextrine. Ensuite, la libération d'IL8 est dosée par ELISA (n=1).

choisi comme niveau de référence, il apparaît que l'expression relative de l'ARNm de TMEM45B est 4,9 fois plus élevée à confluence, 19,2 fois à C+2 et 31,9 fois plus élevée à C+4. L'induction est statistiquement hautement significative à C (** $P < 0,01$) et très hautement significative à C+2 et C+4 (***) ($P < 0,001$) (ANOVA1). Il aurait été intéressant d'observer les niveaux d'ARNm à C+6 également.

De plus, ces résultats peuvent être comparés à l'expression de la filaggrine (**Fig 22**), qui est un marqueur de différenciation tardif, ce qui prouve que les profils d'expression de TMEM45A et TMEM45B sont comparable à l'expression de la filaggrine (Cq compris entre 29 et 31). Il est à noter qu'il existe une forte variabilité dans les données récoltées après mesure des abondances relatives d'ARN messager en filaggrine en C+4.

En conclusion, l'expression du gène TMEM45B est croissante avec la différenciation.

B. Analyse de l'expression des protéines

a. Protéine transmembranaire 45B

L'analyse protéique par Western blot est réalisée afin de confirmer les résultats obtenus grâce à la PCR quantitative. Des analyses protéiques de TMEM45A ont déjà été réalisées dans des recherches précédentes [41, 47], montrant un profil avec plusieurs bandes détectées. En ce qui concerne TMEM45B, certains domaines de la séquence protéique sont responsables d'agrégation thermique dans des gels SDS-PAGE. Effectivement, lorsque les protéines sont chauffées elles forment des agrégats et donc le profil obtenu par Western est différent [52]. Le poids moléculaire de TMEM45B est de 31,8 kDa [56], et l'on s'attend donc à observer une bande sur le profil de Western blot obtenu.

Le premier Western réalisé pour la protéine transmembranaire 45B montre un profil avec plusieurs bandes apparentes, mais aucune bande n'est présente au poids moléculaire attendu (**Fig 23**). Cependant, les bandes révélées semblent indiquer une augmentation du signal avec la confluence.

Un deuxième Western blot a été réalisé afin de pouvoir séparer des échantillons chauffés à 37°C et à 100°C. Celui-ci confirme les résultats obtenus précédemment, c'est-à-dire que certaines bandes peuvent être observées mais pas au poids moléculaire attendu (**Fig 24B**). Il ne semble pas y avoir de différence entre les échantillons chauffés à 37°C et à 100°C, alors que cela a été démontré [52]. Par contre, les bandes détectées semblent être légèrement décalées et ne correspondent pas exactement aux poids moléculaires obtenus lors du premier Western.

Etant donné qu'il n'y a pas de bande détectée au poids moléculaire attendu, il est impossible de confirmer que les bandes observées correspondent bien à la protéine transmembranaire 45B. Cependant, il est important de noter que le tampon de lyse utilisé dans notre laboratoire n'est pas le même que le tampon de lyse utilisé par l'équipe qui a démontré cette agrégation thermique. Il est également légitime de se demander si l'anticorps Sigma reconnaît bien la protéine transmembranaire 45B. Si c'est le cas, il est peut-être possible que les protéines transmembranaires 45B se lient entre elles ou à d'autres protéines, expliquant le poids moléculaire observé.

b. Protéine transmembranaire 45A

Dans un second temps, un Western blot est également réalisé afin de détecter la bande TMEM45A en parallèle. Les échantillons sont également séparés en deux : d'un côté les protéines sont chauffées à 100°C durant 5 minutes ; de l'autre elles sont incubées à 37°C durant 3 minutes.

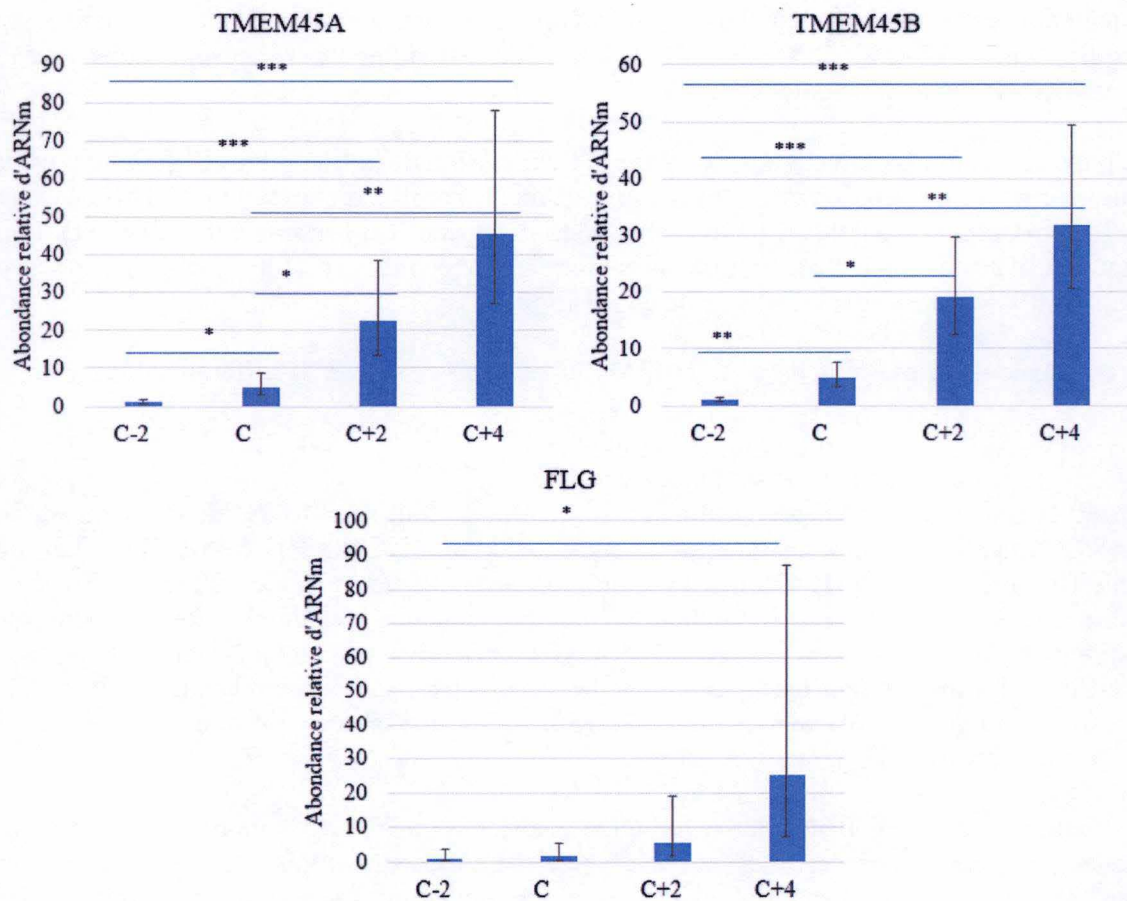


Figure 22 : Abondance relative des ARN messagers de TMEM45A, TMEM45B et de FLG. Des kératinocytes sont cultivés jusqu'à différents stades de confluence (C-2, C, C+2 et C+4). Les niveaux d'abondance sont normalisés par rapport à la moyenne géométrique des gènes de référence TBP et RPLP0. La condition C-2 est arbitrairement fixée à 1. Les barres d'erreurs représentent des intervalles de confiance de 95% (n=3, ANOVA I, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001).

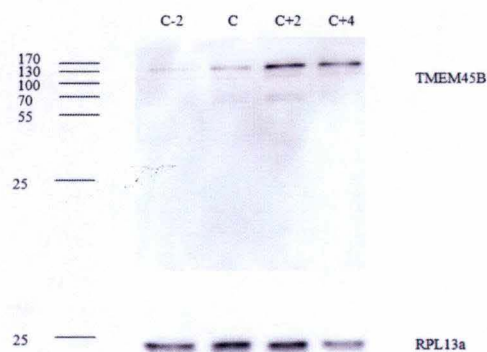


Figure 23 : Détection de la protéine transmembranaire 45B en western blot

Des cultures de kératinocytes sont arrêtées à différents stades de confluence (C-2, C, C+2, C+4) et les protéines sont extraites. Ensuite, elles sont déposées sur un gel d'électrophorèse et séparées en fonction de leurs poids moléculaires. Elles sont transférées sur une membrane et révélées grâce à des anticorps spécifiques et un système de visualisation. Analyse de l'abondance de la protéine transmembranaire 45B. RPL13a est utilisé comme marqueur de charge.

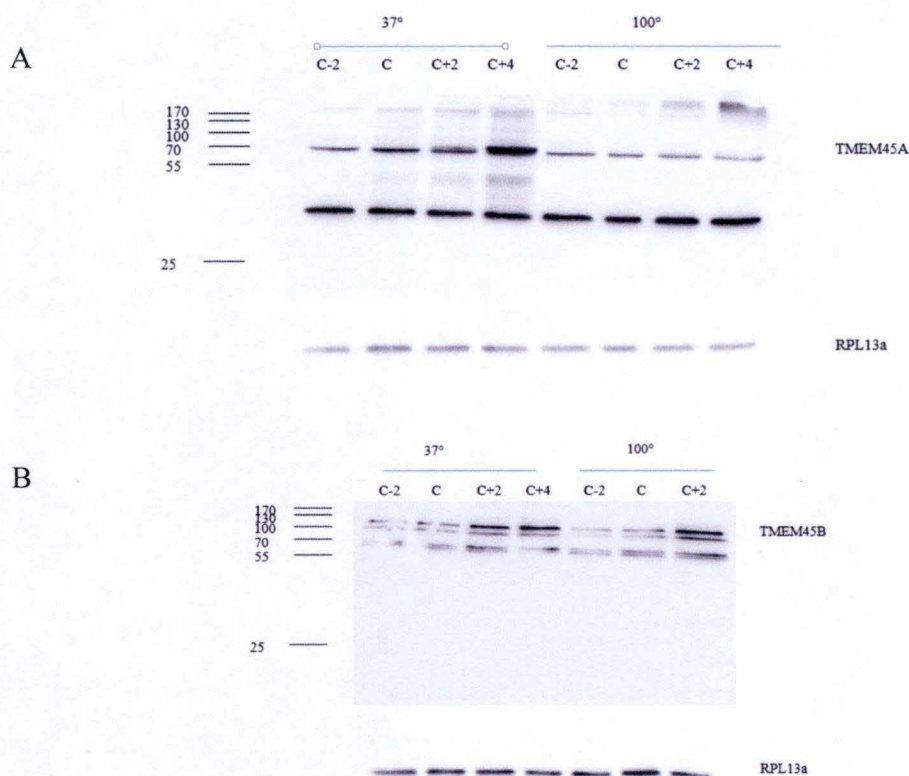


Figure 24 : Détection des protéines transmembranaires 45A et 45B en western blot

Des cultures de kératinocytes sont arrêtées à différents stades de confluence (C-2, C, C+2, C+4) et les protéines sont extraites. Ensuite, elles sont déposées sur un gel d'électrophorèse et séparées en fonction de leurs poids moléculaires. Elles sont transférées sur une membrane et révélées grâce à des anticorps spécifiques et un système de visualisation. Analyse de l'abondance de la protéine transmembranaire 45A (A) et 45B (B). RPL13a est utilisé comme marqueur de charge.

Les résultats obtenus pour TMEM45A semblent indiquer plusieurs bandes, de la même manière que d'autres études l'ont montré [41, 47]. Il y a bien une bande au poids moléculaire attendu (31 kDa [56]), mais le profil n'est pas le même que celui obtenu par Lionel Flamant [41] (**Fig 24A**). Effectivement, une bande apparaît dans nos recherches à 30 kDa tandis que, lors des recherches de Lionel Flamant, une bande apparaît à ± 70 kDa dont l'intensité augmente avec la confluence. Il est possible cependant que cette bande corresponde à deux protéines liées.

Lors des recherches d'Auréli Hayez et D'Edith Roegiers, une analyse protéique a été réalisée afin de comparer les profils obtenus par Western blot lorsque les kératinocytes sont invalidés ou non [46, 47]. Lorsque les kératinocytes ne sont pas invalidés, des bandes apparaissent entre 25 et 37 kDa et disparaissent lorsque TMEM45A est invalidé dans des cultures de kératinocytes post-confluentes. Or, lors de nos analyses, une bande apparaît fort marquée à 30 kDa.

Il est donc impossible de confirmer que la bande obtenue lors de nos analyses correspond bien à la protéine transmembranaire 45A.

En conclusion, il serait utile de réaliser un Western blot sur des kératinocytes invalidés pour TMEM45A afin de vérifier la spécificité de l'anticorps utilisé et de vérifier si les résultats obtenus sont identiques à ceux obtenus dans les précédentes recherches. Il serait également utile d'invalider les kératinocytes pour TMEM45B afin d'observer les conséquences lors de ces analyses protéiques.

A. Marquage & localisation

a. Peau normale et épidermes humains reconstruits

Afin de compléter l'analyse de l'expression de TMEM45B, des marquages immunofluorescents ont été réalisés pour localiser la protéine transmembranaire 45B et observer si la localisation était identique à celle de la protéine transmembranaire 45A. Effectivement, la protéine transmembranaire 45A a été localisée majoritairement dans les couches granuleuse et cornée de l'épiderme ainsi que partiellement dans le trans-golgi et le réseau trans-golgien des kératinocytes [45].

Dans un premier temps, une mise au point du marquage de la protéine transmembranaire 45B a été réalisé sur des coupes de peaux normales et sur des épidermes reconstruits. Un marquage sur coupe en paraffine a d'abord été réalisé : le marquage semble présent dans toutes les couches, mis à part un signal plus intense perçu dans la couche granuleuse par rapport au contrôle négatif réalisé sans anticorps primaire (**Fig 25**). Afin d'améliorer la détection, un marquage de la protéine transmembranaire 45B a été réalisé sur coupe à congélation de peaux normales (**Fig 26**) et d'épidermes reconstruits (**Fig 27**) en parallèle avec un marquage de la protéine transmembranaire 45A.

Si le signal provenant de la détection de la protéine transmembranaire 45A est intense et localisé spécifiquement dans la couche granuleuse, il n'en est pas de même pour le signal provenant de la détection de la protéine transmembranaire 45B. Effectivement, le signal est diffus et semble localisé dans toutes les couches de l'épiderme. Quelques granules ont été observés, et il semble que les noyaux soient également légèrement marqués.

De plus, des marquages immunofluorescents de la filaggrine, un marqueur de différenciation tardif, ont été réalisés afin de comparer la localisation de TMEM45B et de la filaggrine (**Fig 28**). Le signal observé pour la filaggrine est détecté dans la couche cornée contrairement au signal perçu pour la protéine transmembranaire 45B.

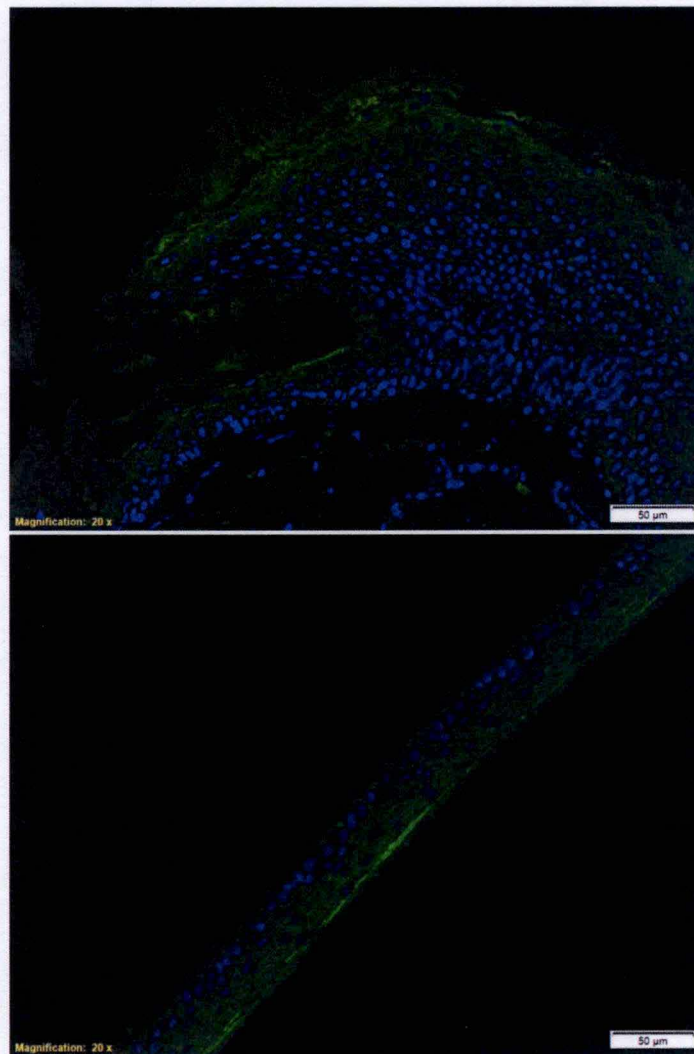


Figure 25 : Immunomarquage de la protéine transmembranaire 45B sur coupe en paraffine de peaux normales et d'épiderme reconstruit

Immunomarquage de TMEM45B sur coupes en paraffine de peau normale (A) et d'épiderme humain reconstruit à J11 (B). Marquage des noyaux par le Hoechst 33258. Barres d'échelle : 50 μm

b. Culture de kératinocytes

Dans un deuxième temps, un marquage de la protéine transmembranaire 45B a été réalisé sur des cultures en monocouche de kératinocytes à différents stades de confluence : sous-confluence (C-2), confluence (C), post-confluence (C+2, C+4). Puisque la protéine transmembranaire 45B est une protéine transmembranaire prédite, sa localisation a été comparée également à des marqueurs spécifiques du système membranaire. Les marqueurs GM130 (Fig 13) et golgin-97 (Fig 14) furent utilisés, respectivement en tant que protéine matricielle du cis-golgi et du réseau cis-golgien, et protéine du trans-golgi et du réseau trans-golgien.

Les résultats indiquent que la détection de la protéine transmembranaire 45B se révèle très difficile. De manière surprenante, il n'y a pas de différence de signal entre la détection observée dans des cultures de kératinocytes sous-confluentes et des cultures de kératinocytes post-confluentes. Un signal est observé dans le noyau. Par contre, il n'y a pas de co-localisation de signal entre GM130 et la protéine transmembranaire 45B, ni entre la Golgin-97 et la protéine transmembranaire 45B.

En conclusion, le signal associé à la protéine transmembranaire 45B n'est pas identique à celui associé à la protéine transmembranaire 45A. Dans des peaux normales et des épidermes reconstruits, le signal associé à la protéine transmembranaire 45B est présent dans toutes les couches, tandis qu'un signal imprécis est observé au niveau des cultures de kératinocytes en monocouches. La localisation de la protéine transmembranaire 45B n'est donc pas encore parfaitement déterminée. Il serait utile de vérifier la spécificité de l'anticorps également.

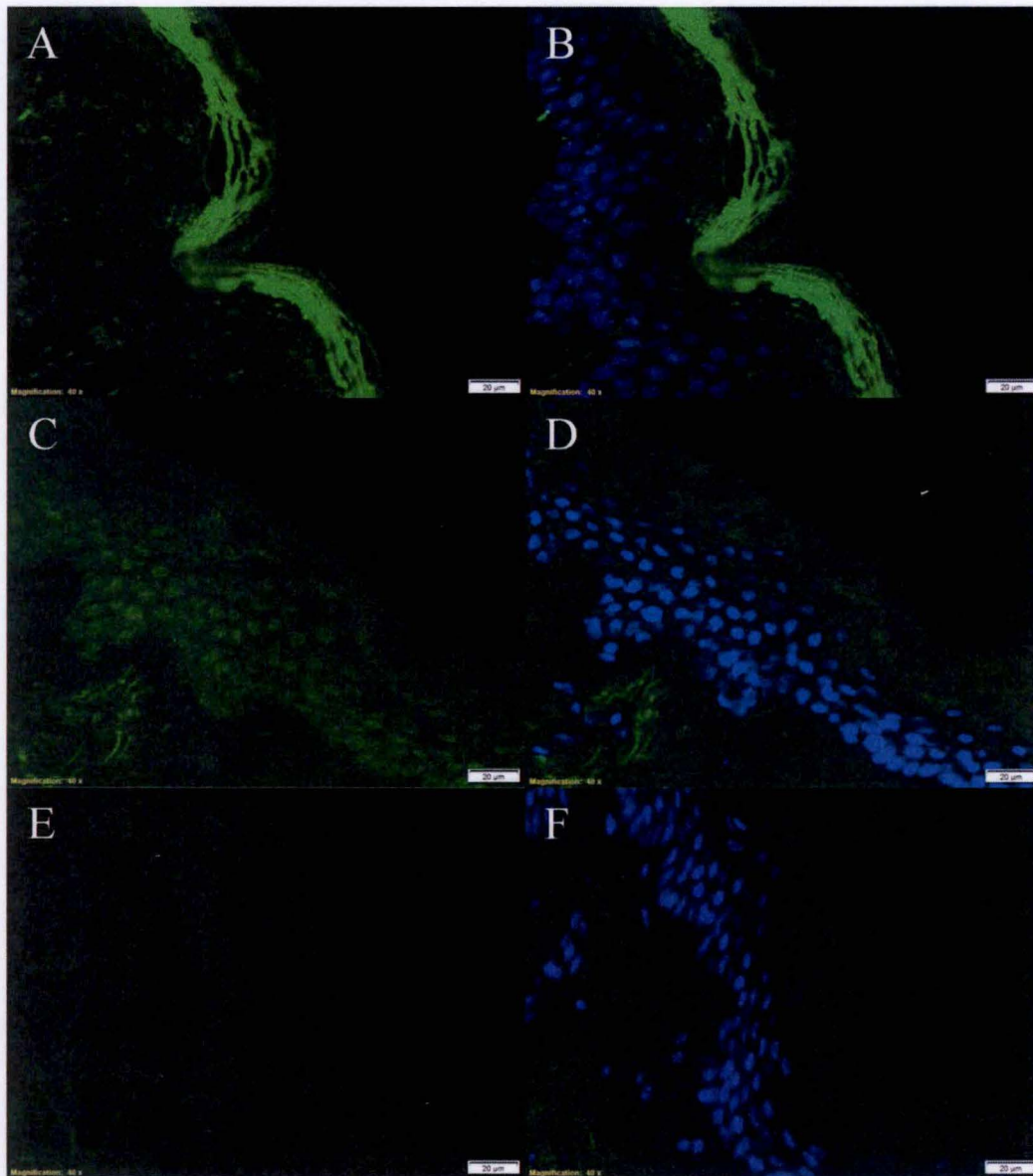


Figure 26 : Immunomarquage des protéines transmembranaires 45A et 45B sur coupes à congélation de peaux normales

Immunomarquage de TMEM45A (A,B) et TMEM45B (C,D) sur coupes à congélation de peau normale. Un contrôle négatif sans anticorps primaire a été réalisé (E,F). Marquage des noyaux par le Hoechst 33258. Barres d'échelle : 20 µm

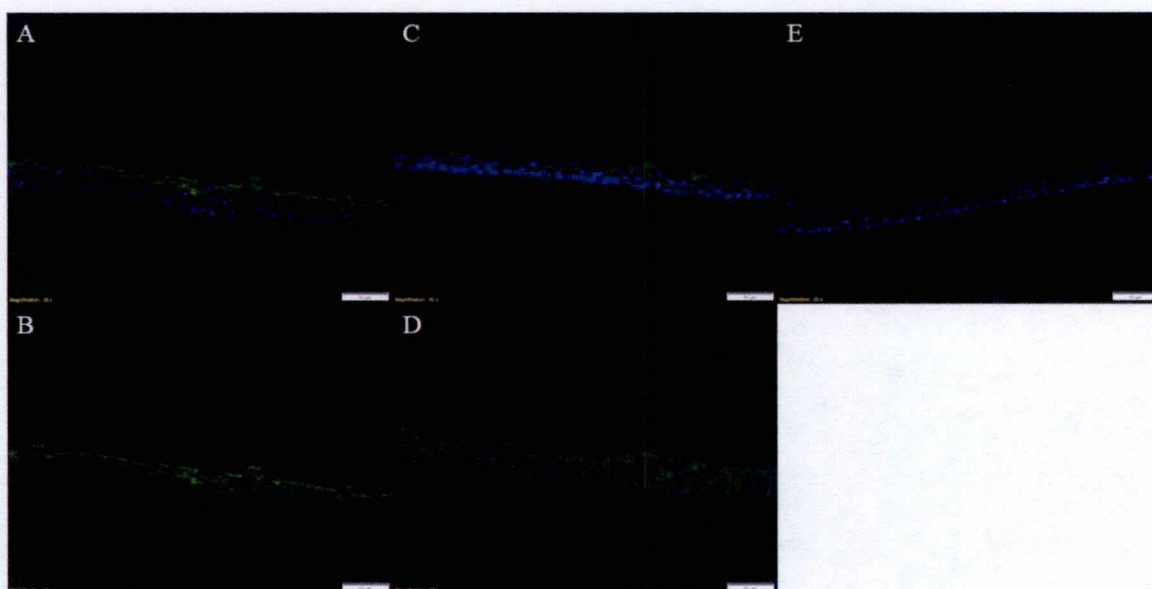


Figure 27 : Immunomarquage des protéines transmembranaires 45A et 45B sur coupes à congélation d'épidermes reconstruits

Immunomarquage de TMEM45A (A,B) et TMEM45B (C,D) sur coupes à congélation d'épidermes reconstruits. Un contrôle négatif sans anticorps primaire a été réalisé (E). Marquage des noyaux par le Hoechst 33258. Barres d'échelle : 50 μ m

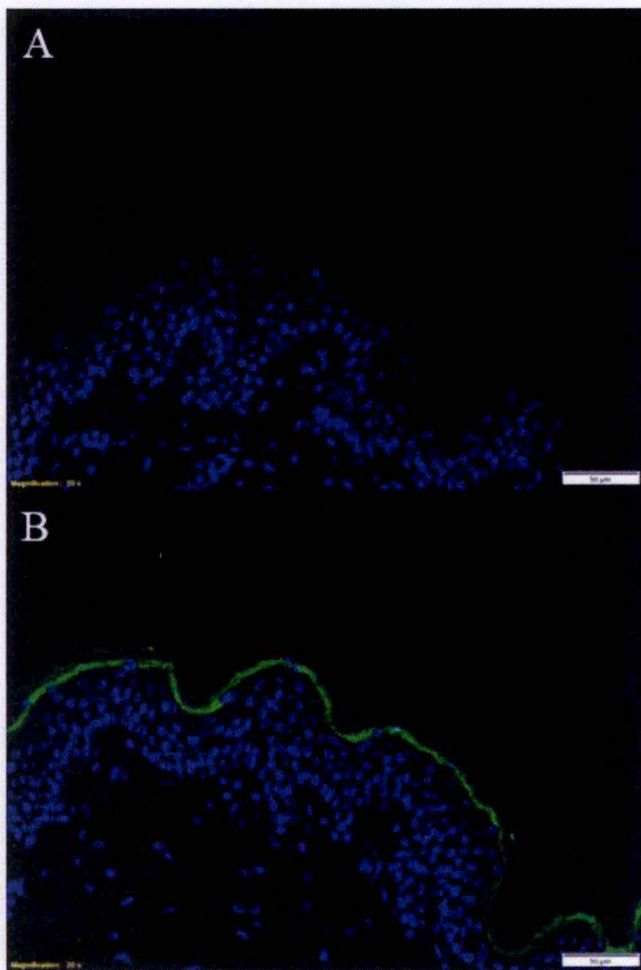


Figure 28 : Immunomarquage de la filaggrine sur peau normale

Immunomarquage de la filaggrine (B). Un contrôle négatif sans anticorps primaire a été réalisé (A). Marquage des noyaux par le Hoechst 33258. Barres d'échelle : 50 μ M

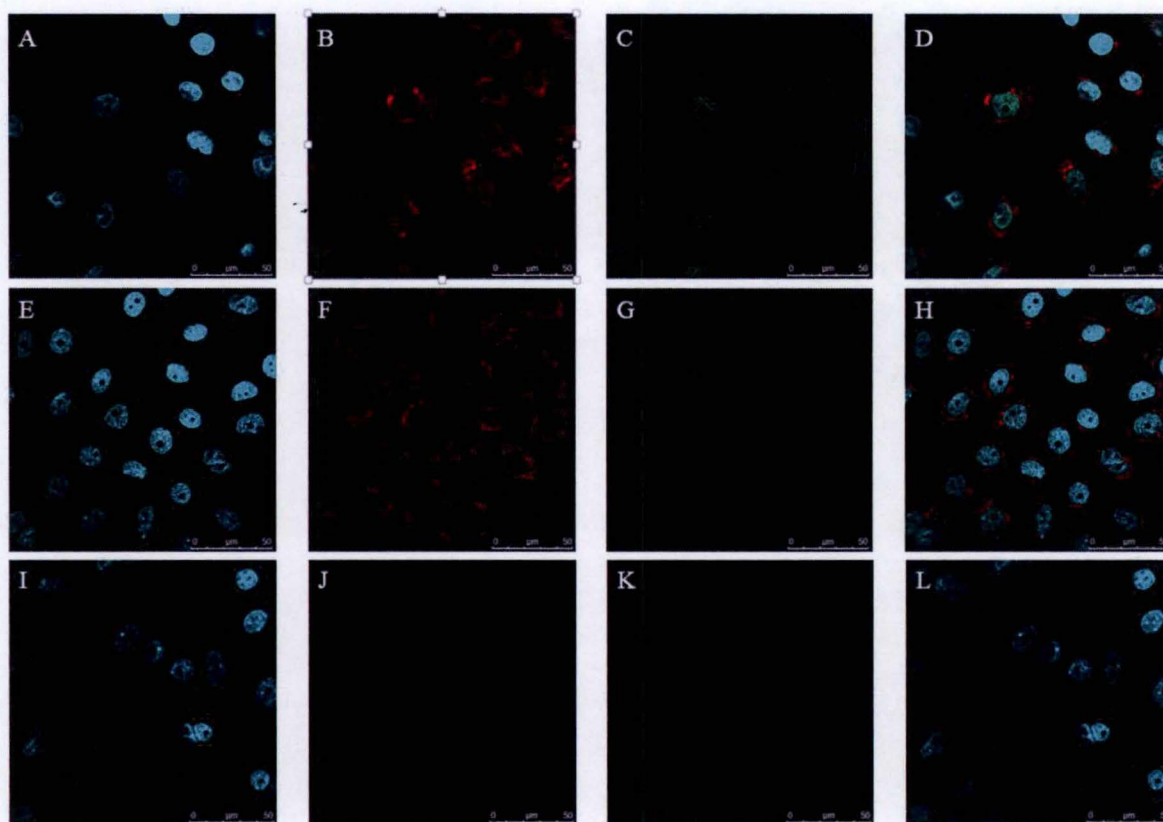


Figure 29 : Codétection de TMEM45B et de GM130 dans des cultures de kératinocytes à sous confluence et à post confluence

Codétection de TMEM45B en vert et GM130 en rouge dans des cultures de kératinocytes à sous-confluence (A,B,C,D) et post-confluence (C+4) (E,F,G,H). Contrôle négatif sans anticorps primaire réalisé (I,J,K,L).

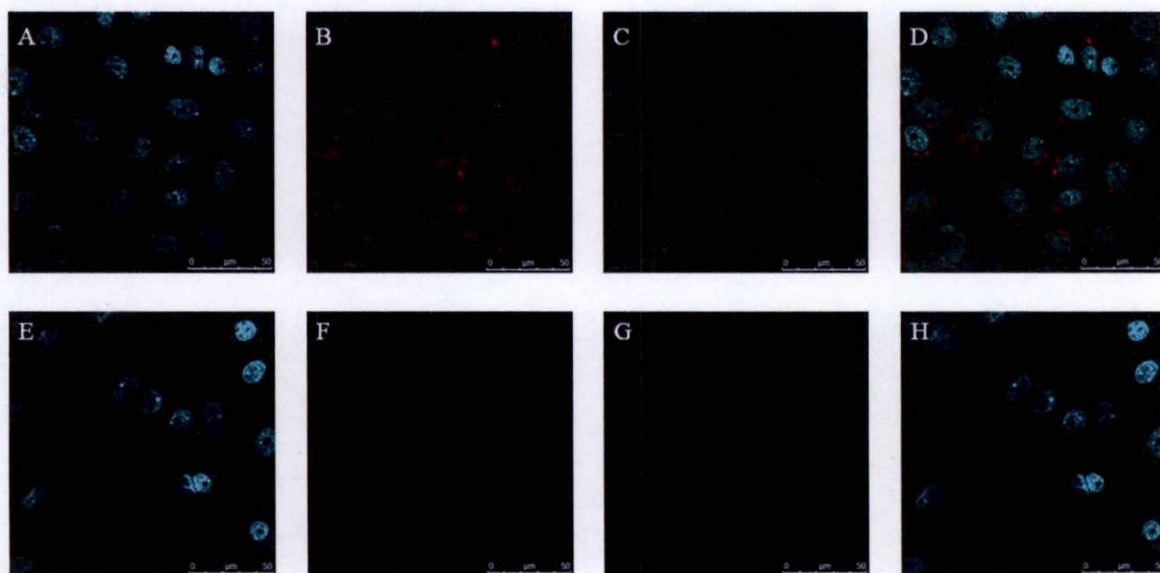


Figure 30 : Codétection de TMEM45B et Golgi97 dans des cultures de kératinocytes à post confluence

Codétection de TMEM45B en vert et Golgi97 en rouge dans des cultures de kératinocytes à post-confluence (A,B,C,D). Contrôle négatif sans anticorps primaire réalisé (E,F,G,H).

Discussion

Discussion & perspectives

Ce mémoire a permis d'étudier les fonctions du gène TMEM45A dans des kératinocytes humains épidermiques normaux, mais de préciser également l'expression d'un gène de la même famille, TMEM45B. Ce mémoire se divise donc en deux parties, et s'il n'a pas vraiment permis de répondre totalement à nos questions, il en soulève bien d'autres et des recherches supplémentaires seraient nécessaires.

1. Première partie : rôle potentiel de TMEM45A dans l'exocytose

A. Toxicité de l'ionomycine

La première partie de ce mémoire a été consacrée à l'étude du rôle de TMEM45A dans l'exocytose. Afin de pouvoir analyser celle-ci, divers outils ont dû être mis au point pour étudier l'exocytose dont sont capables les kératinocytes invalidés pour TMEM45A. Afin de pouvoir induire une exocytose dans des cultures de kératinocytes en monocouche, l'ionomycine a été utilisée. Cette molécule permet d'augmenter la concentration intracellulaire en Ca^{2+} en créant des pores pour cet ion dans les membranes plasmiques cellulaires. Afin de vérifier si l'ionomycine n'induit pas une mort cellulaire excessive pour nos études, un test MTT a été réalisé, soit immédiatement après incubation avec l'ionomycine, soit 24h après l'incubation. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que l'ionomycine n'affecte pas la viabilité cellulaire de manière significative immédiatement après incubation avec l'ionomycine. De manière surprenante, une baisse de la viabilité cellulaire a été observée lorsque les cellules sont incubées avec la plus faible concentration en ionomycine. Ceci reste cependant à confirmer puisque le test n'a été réalisé qu'une seule fois.

Par contre, les résultats obtenus après 24h de récupération montrent un effet toxique de l'ionomycine pour les cellules. Effectivement, celles-ci sont incapables de récupérer suite à un tel traitement. Ceci pourrait s'expliquer par le mécanisme par lequel l'ionomycine induit l'entrée des ions Ca^{2+} dans la cellule en formant des canaux qui rendent la cellule sensible. L'ionomycine est également connue pour son effet assez rapide sur les cellules.

Suite à ces résultats, et en accord avec les études de Ralph Jans et d'Aurélié Hayez, nous avons choisi de mettre au point les outils permettant d'étudier l'exocytose immédiatement après l'incubation avec l'ionomycine [24, 47].

B. Analyse de la redistribution de LAMP1 en surface

Le premier test à mettre au point a été de rendre possible la visualisation de la redistribution de LAMP1 en surface. Effectivement, une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} provoque l'exocytose ainsi que le suggère une redistribution de LAMP1 en surface des kératinocytes [24].

Plusieurs mises au point ont été nécessaires. Premièrement, une détection de LAMP1 a été réalisée en incubant les cellules avec du milieu supplémenté en Ca^{2+} et de l'ionomycine ou du DMSO et en perméabilisant celles-ci avant incubation avec l'anticorps primaire. Le signal observé correspond à un signal faible périnucléaire, indépendamment de la condition. Il est donc impossible de différencier les signaux observés, et donc impossible dans ce cas de confirmer que l'exocytose a bien eu lieu.

A cause de ces observations, nous avons vérifié divers paramètres de notre protocole et nous avons essayé de mettre au point une détection qui fonctionne. Un autre anticorps secondaire (Alexa Fluor 488 nm) et du PBS avec du Ca^{2+} ont été utilisés afin d'obtenir un meilleur signal. Finalement, nous avons choisi de ne pas perméabiliser les cellules avant incubation avec

l'anticorps primaire et une différence de détection a été observée : lorsque les cellules sont perméabilisées, un signal périnucléaire est observé. Mais lorsque les cellules ne sont pas perméabilisées, un signal à la membrane plasmique apparaît lorsqu'elles sont incubées avec l'ionomycine, suggérant que l'exocytose provoquée implique la relocalisation de LAMP1 en surface et donc permet à l'antigène d'être accessible. Ces résultats ont permis d'indiquer que l'exocytose a effectivement lieu lorsque les cellules sont incubées avec l'ionomycine.

Cependant, le marquage des membranes cellulaires n'est pas distinct, et il a été impossible de reproduire les résultats en obtenant un signal correct. Le problème pourrait se situer dans la manière de fixer les cellules, dans la saturation des antigènes, mais il est également possible que l'anticorps utilisé ne soit pas assez spécifique pour obtenir un signal distinct.

Nous n'avons donc pas pu utiliser cet outil afin d'étudier l'exocytose sur des kératinocytes invalidés pour l'expression de TMEM45A.

C. Exocytose d'ATP

Simultanément à la mise au point de l'analyse de la redistribution de LAMP1, deux autres outils ont également été utilisés : la mesure de l'ATP extracellulaire et la visualisation des vésicules d'ATP. Effectivement, il a été montré que l'ionomycine induit l'exocytose des vésicules d'ATP [18].

Premièrement, une mise au point de la visualisation des vésicules d'ATP a été réalisée grâce à la quinacrine, une sonde fluorescente capable de marquer les vésicules d'ATP. Des kératinocytes ont été incubés avec du milieu complet contenant 1 mM de Ca^{2+} et 30 μM d'ionomycine, et comparées à des cultures incubées avec du milieu complet contenant 1 mM de Ca^{2+} et 0,3% de DMSO, puis incubées avec la quinacrine. Le signal de la condition contrôle apparaît granuleux, ce qui correspond aux vésicules d'ATP. Un signal granuleux mais moins intense est remarqué après incubation avec le DMSO, ce qui peut suggérer que le DMSO ait un effet légèrement toxique ou provoque une légère exocytose. Les résultats du test de viabilité cellulaire obtenu précédemment ne montrent pas cette observation, même si une légère baisse de la viabilité cellulaire est observée. Il est également possible que le DMSO induise une libération d'ATP par d'autres mécanismes, sachant que l'ATP peut être libéré de différentes manières. Par exemple, une étude a montré que la fusion et la libération de neurotransmetteurs de neurones moteurs peut être induite par le DMSO [57].

Lors de l'analyse de la redistribution de LAMP1 en surface, cet effet n'a pas vraiment été observé : nous n'observons pas de signal lorsque les cellules ne sont pas perméabilisées et incubées avec du DMSO. Cette légère exocytose n'est pas confirmée bien que les mécanismes d'exocytose des lysosomes et des vésicules d'ATP peuvent être radicalement différents.

Par contre, le signal cytoplasmique disparaît et laisse place à un signal faible au niveau du noyau lorsque les cellules sont incubées avec l'ionomycine, ce qui suggère que l'exocytose a bien eu lieu. Le marquage nucléaire peut être dû au fait que la quinacrine est également capable de marquer les acides nucléiques. Par conséquent, la visualisation des vésicules d'ATP a été considérée comme outil permettant d'analyser l'effet de l'invalidation de TMEM45A sur l'exocytose des kératinocytes.

Deuxièmement, afin de confirmer que l'ATP ait bien été exocyté, la concentration d'ATP extracellulaire présent dans les milieux de cultures des kératinocytes a été mesurée après incubation avec du milieu complet supplémenté en Ca^{2+} et de l'ionomycine, de l'ionomycine et de l'EGTA, ou du DMSO, durant 20 ou 60 minutes.

Les résultats obtenus montrent qu'une concentration en ATP extracellulaire plus élevée est retrouvée dans le milieu prélevé de culture des kératinocytes incubés avec l'ionomycine. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment, c'est-à-dire que l'exocytose a lieu et que l'ATP a été effectivement sécrété.

Une concentration basale d'ATP extracellulaire peut être mesurée dans les milieux. Cependant, ces recherches *in vitro* mentionnent un niveau avoisinant les 10 nM alors que nous retrouvons plus ou moins 40 nM d'ATP extracellulaire [16, 17, 58].

Ceci pourrait être dû à la culture des kératinocytes, au fait que ceux-ci seraient légèrement stressés, mais aussi à une dégradation incorrecte de l'ATP puisqu'on sait que des enzymes présentes à la surface des cellules sont capables de dégrader l'ATP extracellulaire [17]. De plus, nous nous attendions à observer le léger effet d'une incubation avec le DMSO sur les kératinocytes en mesurant une concentration extracellulaire en ATP plus élevée, mais nous ne retrouvons pas l'effet du DMSO observé lors du marquage des vésicules d'ATP par la quinacrine.

Ces résultats confirment le fait que l'exocytose d'ATP a bien eu lieu. Par conséquent la mesure de l'ATP extracellulaire pourrait constituer donc un outil valide afin d'étudier les éventuelles interventions de TMEM45A dans l'exocytose. Cependant, l'expérience n'a pas été reproductible et ces résultats n'ont pas pu être confirmés. La cause en reste inconnue, mais quelques hypothèses peuvent tout de même être émises. Par exemple, les milieux de cultures dosés ont été prélevés à partir des cultures de kératinocytes utilisées également pour la mise au point de la visualisation de LAMP1. Etant donné que nous n'obtenons pas un signal correct pour l'analyse de la redistribution de LAMP1 et que nous ne pouvons pas confirmer l'exocytose d'ATP, il est possible que les conditions de culture aient été inadéquates, provoquant par exemple un éventuel stress cellulaire que nous n'avons pas repéré.

Une mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) serait utile afin de pouvoir évaluer l'intégrité de la membrane plasmique et par conséquent garantir la culture de kératinocytes viables. Effectivement, la LDH est une enzyme cytosolique : sa libération permet de signaler la lyse cellulaire, et même d'évaluer les dégâts tissulaires lors de la détection de certains cancers [59, 60]. Il est utile de signaler que Ralph Jans a montré qu'une incubation de kératinocytes avec l'ionomycine n'affecte pas la perméabilité de la membrane plasmique puisque l'ionomycine n'affecte pas le pourcentage d'activité de la LDH [55].

D. Réponse inflammatoire

Puisque des études ont montré que les kératinocytes sont impliqués dans la réponse inflammatoire épidermique et qu'ils sont capables de libérer diverses cytokines, il a également été intéressant d'étudier l'exocytose du TNF- α et de l'IL-8. Des cultures confluentes de kératinocytes ont été incubées avec du milieu complet contenant 1 mM de Ca²⁺ et 30 μ M d'ionomycine, du DMSO ou de l'ionomycine et de l'EGTA durant 20 minutes ou 60 minutes. Tout d'abord, les valeurs obtenues lors du dosage du TNF- α sont en dessous du seuil de détection du système utilisé, c'est-à-dire 4 pg/ml. Ceci signifie qu'il n'y a pas de libération de TNF- α , avec ou sans ionomycine.

Pour le dosage d'IL-8, des milieux supplémentaires ont été prélevés après incubation de kératinocytes avec un agent déplétant la membrane plasmique de cholestérol, la méthyl- β -cyclodextrine, durant 60 minutes. Soit les milieux ont été prélevés immédiatement, soit les milieux ont été prélevés après une heure de récupération dans du milieu complet.

A nouveau, les résultats obtenus ne permettent pas d'observer davantage une différence entre les quantités d'IL-8 libérée par les kératinocytes incubés avec l'ionomycine et les kératinocytes incubés dans les conditions contrôle. En revanche, une quantité supérieure d'IL-8 est retrouvée dans les milieux prélevés à partir de kératinocytes incubés avec la méthyl- β -cyclodextrine, ce qui correspond aux résultats présentés par Conny Mathay dans sa thèse [29]. Ceci peut donc être utilisé comme contrôle positif.

Si l'ionomycine n'a pas d'effet sur l'exocytose de l'IL-8 et du TNF- α , il serait possible d'utiliser une molécule typiquement pro-inflammatoire, telle que le LPS ou la flagelline, afin de provoquer un stress cellulaire et observer une éventuelle exocytose. Comme expliqué dans l'introduction, les kératinocytes sont capables de libérer certaines cytokines en cas d'inflammation. La flagelline est capable de mimer une situation d'infection bactérienne et le gène codant pour le TNF- α est fortement induit lorsque des kératinocytes sont exposés à la flagelline [61]. Le LPS quant à lui est également capable d'induire une réponse inflammatoire, tant dans des épidermes reconstruits [62] que chez des kératinocytes murins [63].

La protéine transmembranaire 45A étant localisée dans le réseau trans-golgien, elle pourrait être impliquée dans des processus spécifiques de sécrétion en conditions inflammatoires.

Par conséquent, nous n'avons pas réussi à mettre au point des outils permettant d'étudier valablement les phénomènes d'exocytose dans les kératinocytes et le rôle potentiel de TMEM45A dans celle-ci. Si la mise en évidence des vésicules d'ATP par la quinacrine est mise au point, les autres outils nécessitent encore des ajustements afin de pouvoir les utiliser et ensuite analyser l'exocytose chez des kératinocytes invalidés pour TMEM45A.

Il est intéressant de signaler que lors de ses recherches, Ralph Jans avait investigué l'implication de la concentration extracellulaire en ions Ca^{2+} lors de l'exocytose des lysosomes après incubation avec l'ionomycine [24]. Il avait alors montré qu'une libération des enzymes lysosomales est plus importante lorsque la concentration extracellulaire en ions Ca^{2+} est plus élevée. Il serait donc intéressant de répéter ces expériences avec l'ionomycine, mais en ne supplémentant pas le milieu avec des ions Ca^{2+} , afin d'observer une éventuelle différence et de confirmer les résultats obtenus par Ralph Jans.

Lorsque ces mises au point seront réalisées, les mêmes expériences pourraient être réalisées sur des kératinocytes invalidés pour l'expression de TMEM45A grâce à des shRNA. L'objectif serait de comparer les cellules infectées par des shRNA ciblant l'ARN messager produit par TMEM45A aux cellules normales ou infectées par des shRNA dépourvu de cibles.

E. Autres perspectives

Il se peut que TMEM45A ait un rôle également dans le trafic. Des recherches d'Aurélié Hayez ont montré une différence dans la localisation de deux protéines quand TMEM45A est invalidé : EEA1, une protéine jouant un rôle dans la régulation du trafic endosomal et VPS26, un composant du rétromère qui régule le trafic rétrograde des endosomes vers le réseau trans-golgien (Données non publiées) [47]. Effectivement, des signaux associés à EEA1 et VPS26 ont été observés sous forme de volumineuses structures vésiculaires dans les cultures invalidées, qui pourraient résulter de la fusion d'endosomes précoces entre eux ou avec d'autres compartiments cellulaires. Il serait intéressant de creuser cette hypothèse en analysant des marqueurs de différents compartiments.

2. Deuxième partie : TMEM45B

Puisqu'il a été impossible de mettre au point les outils permettant d'analyser les fonctions de TMEM45A dans l'exocytose, et que les résultats récents d'Aurélié Hayez dans notre laboratoire ont suscité quelques questions, nous avons posé l'hypothèse que TMEM45B, un autre membre de la famille TMEM45, pourrait compenser l'invalidation de TMEM45A. Effectivement, il n'y a aucune conséquence apparente de l'invalidation de TMEM45A dans divers modèles *in vivo* et *in vitro*, et ceci n'empêche pas l'épiderme de se former de manière normale. Il n'y a donc aucun phénotype particulier.

De plus, la séquence en acides aminés et les structures secondaires prédites des deux protéines partagent certaines similarités. Il y a 44% d'homologie entre les séquences en acides aminés de la protéine transmembranaire 45A (codée par TMEM45A) et de la protéine transmembranaire 45B (codée par TMEM45B) [37]. En outre, la protéine transmembranaire 45B possède d'après les prédictions 6 domaines transmembranaires alors que la protéine transmembranaire 45A en possède entre 3 et 7. Il est donc possible que la protéine transmembranaire 45B par sa structure et sa séquence en acides aminés compense l'invalidation de TMEM45A.

Il y a moins d'informations disponibles sur l'expression et la localisation de TMEM45B. Il a donc été intéressant d'étudier son expression, la régulation de son expression et la localisation de la protéine codée par ce gène, la protéine transmembranaire 45B.

A. Analyse de l'expression des ARN messagers

Une analyse de l'expression de TMEM45B a été réalisée afin d'étudier son expression dans des cultures de kératinocytes. Il est important de noter que si la peau est l'organe où le gène TMEM45A est le plus exprimé, il n'en est pas de même pour TMEM45B : c'est dans le petit intestin et le colon que TMEM45B est le plus exprimé [36].

Les résultats obtenus montrent que l'expression de TMEM45B augmente avec la différenciation. Par rapport au stade C-2 (deux jours avant la confluence), il apparaît que l'expression relative de l'ARNm de TMEM45B est 4,9 fois plus élevée à confluence, 19,2 fois à C+2 (deux jours après la confluence) et 31,9 fois plus élevée à C+4 (quatre jours après la confluence). L'induction est statistiquement hautement significative à confluence et très hautement significative à C+2 et C+4. L'expérience ayant été réalisée trois fois et les amorces étant validées, les résultats obtenus sont fiables. Il serait intéressant d'invalider des kératinocytes pour TMEM45B et d'observer les conséquences, ainsi que d'étudier le niveau d'expression de TMEM45B lorsque TMEM45A est invalidé. Ces résultats ne correspondent pas aux résultats obtenus par Aurélié Hayez lors de son mémoire : effectivement, il semblait y avoir deux phases d'induction du gène : une première en début de différenciation, et une seconde en condition de différenciation plus avancée [64]. Il est important de signaler que la souche cellulaire utilisée n'est pas la même.

Par ailleurs, une autre manière de comparer l'expression de TMEM45B à celle de TMEM45A peut être utilisée. Aurélié Hayez a, lors de son mémoire, normalisé le niveau d'expression de TMEM45B par rapport au niveau d'expression de TMEM45A deux jours avant la confluence (C-2). Elle a observé que le gène TMEM45B était davantage induit que son homologue et ce pour tous les stades [64].

Lorsque nous réalisons ces calculs, les niveaux d'expression de TMEM45A et de TMEM45B semblent identiques à chaque stade de confluence.

Nos données ne confirment ni celles obtenues par Aurélié Hayez lors de son mémoire, ni celles fournies par l'outil informatique BioGPS qui nous informe que l'expression de TMEM45A

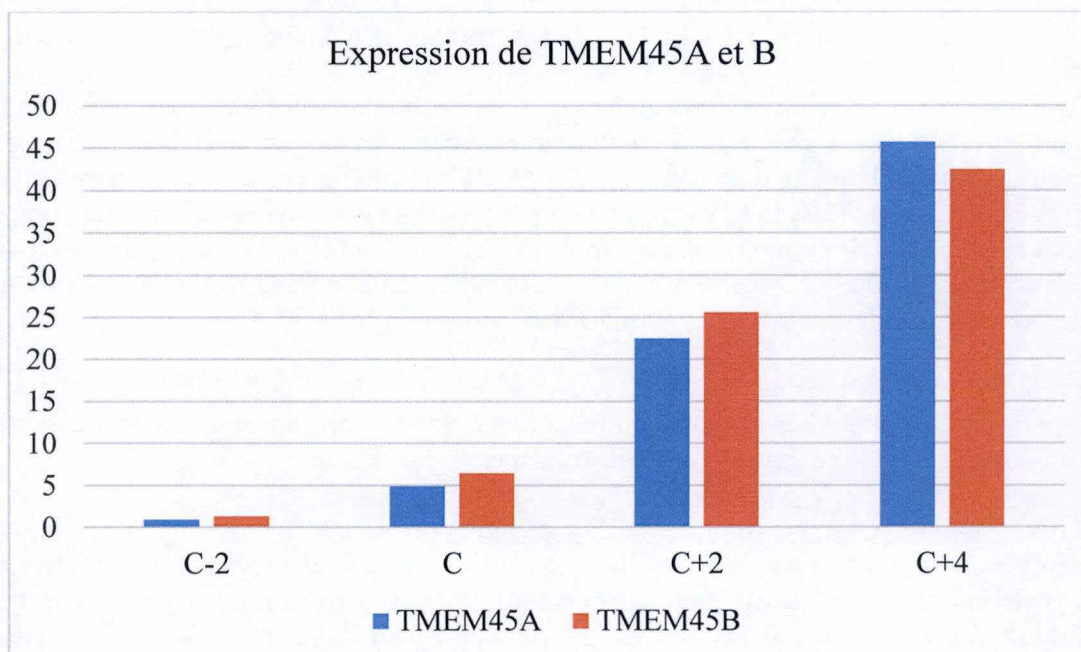


Figure 31 : Expression de TMEM45A et TMEM45B

Abondance relative des ARN messagers de TMEM45A et TMEM45B en culture autocrine à sous-confluence (C-2), confluence (C), post-confluence (C+2 et C+4). Le niveau d'ARN messager de TMEM45A au stade C-2 a été utilisé comme référence. Les niveaux d'abondance sont normalisés par rapport à la moyenne géométrique des gènes de référence TBP et RPLP0 (n=3).

dans la peau est plus élevée que celle de TMEM45B [36]. Ces données intéressantes pourraient justifier des investigations supplémentaires (**Fig 31**).

Ensuite, afin de comparer l'expression de TMEM45A et TMEM45B, l'expression relative de l'ARNm de TMEM45A a également été analysée. Les recherches d'Aurélié Hayez ont permis de mettre en évidence l'augmentation de l'expression de TMEM45A avec la différenciation [45]. Nos résultats confirment cette augmentation : par rapport au stade C-2 (deux jours avant la confluence), il apparaît que l'expression relative de l'ARNm de TMEM45A est 4,9 fois plus élevée à confluence, 22,5 fois à C+2 (deux jours après confluence) et 45,8 fois plus élevée à C+4 (quatre jours après confluence). L'induction est statistiquement significative à C et très hautement significative à C+2 et C+4. Donc, l'expression relative de l'ARNm de TMEM45B suit le même profil au cours de la différenciation induite par la confluence que l'expression de TMEM45A. Il aurait par contre été intéressant d'observer les niveaux d'ARNm à C+6 (six jours après confluence).

De plus, nos résultats peuvent être comparés à l'expression de la filaggrine, qui est un marqueur de différenciation tardif. Bien qu'il existe une forte variabilité dans nos données récoltées après mesures des abondances relatives d'ARNm quatre jours après la confluence pour l'expression de la filaggrine, le profil d'expression obtenu montre que l'expression de la filaggrine augmente avec la différenciation, en accord avec la présence de la filaggrine dans la couche cornée [11].

En conclusion, d'après ces résultats, il est fort possible que l'expression de TMEM45B augmente avec la différenciation. Il serait intéressant de confirmer ces résultats en analysant l'expression de TMEM45B dans des épidermes humains reconstruits, à différents jours de croissance.

B. Analyse de l'expression des protéines

L'analyse protéique par Western blot a été réalisée afin de confirmer les résultats obtenus grâce à la PCR quantitative. Des analyses protéiques de TMEM45A et de TMEM45B ont été réalisées en parallèle, toujours dans l'objectif de comparer l'expression de ces deux gènes. En ce qui concerne TMEM45A, des recherches ont déjà été menées par Aurélié Hayez, Edith Roegiers et Lionel Flamant sur TMEM45A et ceux-ci ont obtenus des profils de Western blot particuliers : effectivement, plusieurs bandes sont détectées à différents poids moléculaires. Peu de recherches ont été effectuées sur TMEM45B mais certains domaines de la séquence protéique sont responsables d'agrégation thermique dans des gels SDS-PAGE. Effectivement, lorsque les protéines sont chauffées elles forment des agrégats et donc le profil obtenu par Western blot est différent.

Les résultats obtenus par Aurélié Hauez et Edith Roegiers montrent plusieurs bandes pour TMEM45A [46], ce qui correspond à ce que nous obtenons. Il y a bien une bande au poids moléculaire attendu (31 kDa), mais le profil n'est pas le même que celui obtenu par Lionel Flamant [41] ou une bande apparaît à +/- 70 kDa dont l'intensité augmente avec la confluence. Si l'on compare le profil obtenu avec les recherches d'Aurélié Hayez et d'Edith Roegiers, des bandes apparaissent entre 25 et 37 kDa qui disparaissent lorsque TMEM45A est invalidé [46]. Or, lors de nos analyses, une bande apparaît fort marquée à 30 kDa. Il est donc impossible de confirmer que la bande obtenue lors de nos analyses correspond bien à la protéine codée par TMEM45A.

Aurélié Hayez et Edith Roegiers ont comparé le profil Western obtenu lorsque les kératinocytes sont ou non invalidés, afin de confirmer que les bandes obtenues correspondent à la protéine

transmembranaire 45A [46]. Pour vérifier la véracité de nos analyses, nous pourrions réaliser la même expérience. Nous pourrions également récupérer les protéines présentes sur le gel et réaliser une spectrométrie de masse afin de vérifier si la protéine transmembranaire 45A est bien présente. Finalement, l'anticorps utilisé dans les autres recherches n'est pas le même que nous avons utilisé : puisque l'anticorps provenant de chez Sigma n'est plus disponible, nous avons utilisé un anticorps provenant de chez Santa Cruz. Les épitopes reconnus par les deux anticorps ne sont peut-être pas les mêmes : bien que les deux anticorps reconnaissent un épitope situé du côté C-terminal de la protéine transmembranaire 45A, l'épitope reconnu par l'anticorps provenant de chez Santa Cruz n'est pas renseigné. Il est donc possible que cette différence donne un autre profil si les anticorps utilisés ne sont pas assez spécifiques, ou si les conditions d'utilisation des anticorps ne sont pas adaptées.

Dans l'optique d'analyser l'expression et la régulation de l'expression de TMEM45B, des Western blot ont également été réalisés pour détecter la protéine transmembranaire 45B. Il est important de noter que de récentes recherches ont montré que certains domaines de la séquence protéique sont responsables d'agrégation thermique dans des gels SDS-PAGE. Effectivement, lorsque les protéines sont chauffées elles forment des agrégats et donc le profil obtenu par Western blot est différent [52]. Afin d'obtenir une détection correcte de la protéine transmembranaire 45B, il faut donc chauffer les protéines à 37°C et non 100°C avant électrophorèse.

Le premier profil obtenu montre un profil avec plusieurs bandes apparentes, mais aucune bande n'est présente au poids moléculaire attendu. Cependant, les bandes révélées semblent indiquer une augmentation du signal avec la confluence. Afin de confirmer le résultat, un deuxième Western a été réalisé : les résultats obtenus sont les mêmes, il n'y a toujours pas de bande apparente au poids attendu. Cependant, il n'y a pas de différence observable entre le profil obtenu lorsque les protéines sont chauffées à 37°C et le profil obtenu lorsque les protéines sont chauffées à 100°C. De plus, les bandes détectées semblent légèrement décalées par rapport au premier profil. Il est important de signaler qu'un des puits n'a pas été bien chargé avec les protéines, et que le profil de ce puits n'est donc pas détectable.

Plusieurs hypothèses sont émises quant à ces résultats inattendus : nous pensons que les bandes dont l'intensité augmente avec la confluence correspondent bien à la protéine transmembranaire 45B, puisque l'augmentation de l'expression de TMEM45B a été démontrée par PCR dans les expériences précédentes. Cependant, le poids moléculaire à retrouver étant de 32 kDa, il se peut que l'anticorps utilisé et provenant de la firme Sigma ne soit pas spécifique et ne reconnaisse pas la protéine transmembranaire 45B, mais bien une autre protéine. Il se peut également que les protéines soient agrégées et donc qu'elles ne migrent pas assez lors de l'électrophorèse. Il serait utile de récolter les protéines au niveau des bandes sur la membrane et d'analyser leur composition. Il est possible également que la composition du gel soit inadaptée. Il est aussi probable que l'agrégation thermique des protéines transmembranaires 45B rende l'épitope reconnu par l'anticorps de chez Sigma inaccessible, même si les régions responsables de cette agrégation seraient situées du côté C-terminal.

Il est également important de noter que notre expérience n'a pas été réalisée de la même manière que l'expérience réalisée par l'équipe d'Okada : nous avons cultivé des kératinocytes et extrait les protéines avec un tampon de lyse particulier, tandis qu'ils n'ont pas utilisé le même tampon de lyse. De plus, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre la protéine transmembranaire 45B provenant de chez Sigma, et dont l'épitope correspondant est situé du côté N-Terminal de la protéine, tandis qu'ils ont transfecté des cellules COS7 avec des vecteurs d'expression

exprimant la protéine transmembranaire 45B fusionnée à un tag Myc en partie C-terminale, utile pour la reconnaissance par un anticorps anti-Myc [52].

Cette partie concernant l'analyse protéique et le profil protéique de TMEM45B reste mystérieuse et il n'est pas encore possible de tirer des conclusions ni de confirmer que l'expression de TMEM45B augmente avec la différenciation.

C. Analyse de la localisation de la protéine transmembranaire 45B

Toujours dans l'optique de confirmer les résultats obtenus par PCR où l'expression de TMEM45B augmente avec la confluence, des marquages immunofluorescents ont été réalisés afin de détecter la protéine transmembranaire 45B et d'observer si sa localisation était comparable à celle de la protéine transmembranaire 45A. Aurélie Hayez a bien montré que la protéine transmembranaire 45A est localisée majoritairement dans les couches granuleuse et cornée de l'épiderme, ainsi que partiellement dans le trans-golgi et le réseau trans-golgien des kératinocytes [45].

Afin de réaliser cette immunodétection, des mises au point ont été nécessaires. Premièrement, nous avons réalisé cette détection sur peau normale et sur épiderme humain reconstruit. Le résultat semble montrer un signal dans toutes les couches, avec un signal plus intense perçu dans la couche granuleuse. Nous avons décidé d'améliorer la détection en utilisant des coupes à congélation, et en réalisant en parallèle une détection de la protéine transmembranaire 45A. Le signal obtenu provenant de la détection de la protéine transmembranaire 45A correspond à ce qu'Aurélie Hayez a obtenu dans ses recherches : un signal fort et localisé spécifiquement dans la couche granuleuse [45]. Il n'en est pas de même pour le signal provenant de la détection de la protéine transmembranaire 45B : le signal est diffus et semble localisé dans toutes les couches de l'épiderme. Quelques granules ont été observés, et il semble que les noyaux soient également marqués. Il en est de même pour les épidermes humains reconstruits.

Afin de comparer la localisation des protéines transmembranaires 45A et 45B, nous avons en parallèle réalisé des immunodétections de la filaggrine, puisque celle-ci est exprimée dans la couche cornée [11]. Les résultats obtenus correspondent à ceux attendus : un signal intense est perçu dans les couches supérieures de l'épiderme.

Nous nous attendions à un marquage moins diffus et plus précis de la protéine transmembranaire 45B étant donné que l'expression de TMEM45B augmente avec la différenciation. Plusieurs hypothèses peuvent être émises : soit la technique d'immunofluorescence est moins sensible que la PCR, soit l'anticorps utilisé provenant de chez Sigma n'est pas assez spécifique et ne reconnaît pas uniquement la protéine transmembranaire 45B. Il est aussi possible que le marquage diffus de la protéine transmembranaire 45B soit dû à une régulation post transcriptionnelle puisque de nombreuses régulations ont lieu entre l'expression d'un gène et l'obtention de la protéine correspondante [9]. Cette dernière hypothèse expliquerait les résultats obtenus par Western blot.

Un contrôle positif a été recherché : nous pensions à utiliser des tissus intestinaux étant donné que l'expression de TMEM45B est élevée dans cet organe [36]. Nous avons comme perspective d'utiliser des cellules Caco-2, qui proviennent d'un adénocarcinome colorectal [65]. Les ARNm et les protéines extraites de ces cellules seraient également utiles dans le but de réaliser une analyse de l'expression génique et protéique de TMEM45B.

Dans un second temps, nous avons cultivé des kératinocytes en monocouches afin de détecter la protéine transmembranaire 45B au niveau cellulaire. Différents stades de confluence ont été utilisés : C-2 (deux jours avant la confluence), C (confluence), C+2 (deux jours après la confluence), C+4 (quatre jours après la confluence).

Aurélié Hayez a réalisé des colocalisations de la protéine transmembranaire 45A avec différents marqueurs spécifiques du système membranaire : GM-130 en tant que protéine matricielle du cis-golgi et du réseau cis-golgien, Golgin-97 en tant que protéine du trans-golgi et du réseau trans-golgien, et la calnexine en tant que chaperone du réticulum endoplasmique.

Puisque la protéine transmembranaire 45B est une protéine transmembranaire prédite, sa localisation a également été comparée à ces marqueurs afin de détecter éventuellement une localisation dans le système membranaire. Les résultats indiquent que la détection de la protéine transmembranaire 45B se révèle très difficile. De manière surprenante, aucune différence n'a été observée entre le signal détecté dans des cultures de kératinocytes sous-confluentes et des cultures de kératinocytes post-confluentes. Un signal est observé dans le noyau, mais il n'y a pas de colocalisation de signal entre GM130 et la protéine transmembranaire 45B, ni entre Golgin-97 et la protéine transmembranaire 45B. Lorsque nous avons observé les résultats au microscope confocal, le signal lié à la protéine transmembranaire 45B est apparu aspécifique. Un marquage était présent dans le noyau, ce qui pouvait signifier que le marquage est aspécifique, mais diverses recherches d'autres anticorps dirigés contre la protéine transmembranaire 45B semblent indiquer qu'il y a effectivement bien un marquage dans le noyau [65, 66].

Puisque le marquage semblait aspécifique, nous n'avons pas recherché la possible colocalisation entre la protéine transmembranaire 45B et la calnexine. Il est donc possible que la protéine transmembranaire 45B ait été réellement localisée grâce à ce marquage, ou que l'anticorps utilisé ne soit pas spécifique, ce qui confirmerait les hypothèses citées ci-dessus.

En conclusion, dans des peaux normales et épidermes reconstruits, le signal associé à la protéine transmembranaire 45B est présent dans toutes les couches tandis qu'un signal imprécis est observé sur des cultures de kératinocytes. La localisation de la protéine transmembranaire 45B n'est donc pas encore parfaitement déterminée. Il serait utile de vérifier la spécificité de l'anticorps, mais également d'obtenir un contrôle positif.

3. Conclusions générales et perspectives

En conclusion, ce mémoire n'a pas permis de répondre aux questions posées au départ mais en soulèvent bien d'autres. Nous n'avons pas réussi à mettre au point des outils permettant d'analyser l'exocytose. Cependant, des recherches peuvent encore être menées d'une part quant au rôle de TMEM45A dans le trafic intracellulaire mais d'autre part quant aux observations d'Aurélié Hayez au microscope électronique, où certains granules observés en culture restent non identifiés. De plus, nous avons partiellement réussi à caractériser l'expression de TMEM45B, mais certaines mises au point et validations sont encore à mettre au point. L'objectif serait ensuite d'invalider des kératinocytes avec des shRNA ciblant l'ARN messager produit par TMEM45B et d'observer les éventuelles conséquences. Une double invalidation pour TMEM45A et TMEM45B est également très intéressante afin d'observer les phénotypes *in vitro* mais également *in vivo*.

Bibliographie

Bibliographie

1. Freinkel, R.K. and D.T. Woodley, *The biology of the skin*. 2001: Parthenon Pub. Group. 432.
2. Eckhart, L., et al., *Cell death by cornification*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(12): p. 3471-80.
3. Simpson, C.L., D.M. Patel, and K.J. Green, *Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(9): p. 565-80.
4. Nishifuji, K. and J.S. Yoon, *The stratum corneum: the rampart of the mammalian body*. Vet Dermatol, 2013. **24**(1): p. 60-72 e15-6.
5. Feingold, K.R. and P.M. Elias, *Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(3): p. 280-94.
6. Candi, E., R. Schmidt, and G. Melino, *The cornified envelope: a model of cell death in the skin*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(4): p. 328-40.
7. Nemes, Z. and P.M. Steinert, *Bricks and mortar of the epidermal barrier*. Exp Mol Med, 1999. **31**(1): p. 5-19.
8. Papanikou, E. and B.S. Glick, *Golgi compartmentation and identity*. Curr Opin Cell Biol, 2014. **29**: p. 74-81.
9. Alberts, B., et al., *Molecular biology of the cell*. 6 ed. 2014. 1464.
10. Proksch, E., J.M. Brandner, and J.M. Jensen, *The skin: an indispensable barrier*. Exp Dermatol, 2008. **17**(12): p. 1063-72.
11. Sandilands, A., et al., *Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 9): p. 1285-94.
12. Shirakata, Y., *Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors*. J Dermatol Sci, 2010. **59**(2): p. 73-80.
13. Elias, P. and K. Feingold, *Skin barrier*. CRC Press ed. 2006.
14. Fuchs, E., *Epidermal differentiation: the bare essentials*. J Cell Biol, 1990. **111**(6 Pt 2): p. 2807-14.
15. Ren, H., et al., *Toll-like receptor-triggered calcium mobilization protects mice against bacterial infection through extracellular ATP release*. Infect Immun, 2014. **82**(12): p. 5076-85.
16. Schwiebert, E.M. and A. Zsembery, *Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1615**(1-2): p. 7-32.
17. Lazarowski, E.R., R.C. Boucher, and T.K. Harden, *Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules*. Mol Pharmacol, 2003. **64**(4): p. 785-95.
18. Inoue, K., et al., *Mechanism underlying ATP release in human epidermal keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(5): p. 1465-8.
19. Enyedi, B. and P. Niethammer, *Mechanisms of epithelial wound detection*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(7): p. 398-407.
20. Praetorius, H.A. and J. Leipziger, *ATP release from non-excitabile cells*. Purinergic Signal, 2009. **5**(4): p. 433-46.
21. Giltaire, S., S. Lambert, and Y. Poumay, *HB-EGF synthesis and release induced by cholesterol depletion of human epidermal keratinocytes is controlled by extracellular ATP and involves both p38 and ERK1/2 signaling pathways*. J Cell Physiol, 2011. **226**(6): p. 1651-9.
22. Koizumi, S., et al., *Ca²⁺ waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons: the involvement of extracellular ATP and P2Y₂ receptor activation*. Biochem J, 2004. **380**(Pt 2): p. 329-38.

23. Sawada, K., et al., *Identification of a vesicular nucleotide transporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(15): p. 5683-6.
24. Jans, R., et al., *Calcium entry into keratinocytes induces exocytosis of lysosomes*. Arch Dermatol Res, 2004. **296**(1): p. 30-41.
25. Barker, J.N., et al., *Keratinocytes as initiators of inflammation*. Lancet, 1991. **337**(8735): p. 211-4.
26. Portou, M.J., et al., *The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: A review*. Vascu Pharmacol, 2015.
27. Nestle, F.O., et al., *Skin immune sentinels in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(10): p. 679-91.
28. Holmes, W.E., et al., *Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor*. Science, 1991. **253**(5025): p. 1278-80.
29. Mathay, C., *Study of cell responses after lipid raft disruption by cholesterol depletion in epidermal keratinocytes*, in URPhyM, Faculté de Médecine. 2010, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix.
30. Bickel, M., *The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation*. J Periodontol, 1993. **64**(5 Suppl): p. 456-60.
31. Roupe, K.M., et al., *Injury is a major inducer of epidermal innate immune responses during wound healing*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(4): p. 1167-77.
32. Shurety, W., et al., *Localization and post-Golgi trafficking of tumor necrosis factor-alpha in macrophages*. J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(4): p. 427-38.
33. Suter, M.M., et al., *The keratinocyte in epidermal renewal and defence*. Vet Dermatol, 2009. **20**(5-6): p. 515-32.
34. Kock, A., et al., *Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light*. J Exp Med, 1990. **172**(6): p. 1609-14.
35. Ensembl. 18 mai 2015]; Available from: <http://www.ensembl.org/index.html>.
36. BioGPS. 18 mai 2015]; Available from: <http://biogps.org/#goto=welcome>.
37. NCBI. 13 décembre 2015]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
38. Uniprot. 13 décembre 2015]; Available from: <http://www.uniprot.org/>.
39. Martin-Rendon, E., et al., *Transcriptional profiling of human cord blood CD133+ and cultured bone marrow mesenchymal stem cells in response to hypoxia*. Stem Cells, 2007. **25**(4): p. 1003-12.
40. Benita, Y., et al., *An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(14): p. 4587-602.
41. Flamant, L., et al., *TMEM45A is essential for hypoxia-induced chemoresistance in breast and liver cancer cells*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 391.
42. Gerber, P.A., et al., *Systematic identification and characterization of novel human skin-associated genes encoding membrane and secreted proteins*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e63949.
43. Guo, J., et al., *Inhibition of TMEM45A suppresses proliferation, induces cell cycle arrest and reduces cell invasion in human ovarian cancer cells*. Oncol Rep, 2015. **33**(6): p. 3124-30.
44. Urquidi, V., et al., *A candidate molecular biomarker panel for the detection of bladder cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012. **21**(12): p. 2149-58.
45. Hayez, A., et al., *High TMEM45A expression is correlated to epidermal keratinization*. Exp Dermatol, 2014. **23**(5): p. 339-44.
46. Roegiers, E., *Caractérisation de TMEM45A, une protéine impliquée dans la chimiorésistance*, in Faculté des Sciences, URBC. 2015, Université de Namur.

47. Hayez, A., *Caractérisation de l'expression du gène TMEM45A et de ses fonctions dans les kératinocytes épidermiques humains normaux*, in URPhyM, Faculté de Médecine. 2015, Université de Namur.
48. Beronja, S., et al., *RNAi screens in mice identify physiological regulators of oncogenic growth*. *Nature*, 2013. **501**(7466): p. 185-90.
49. *Interpro*. 13 décembre 2015]; Available from: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>.
50. Paulo, P., et al., *Molecular subtyping of primary prostate cancer reveals specific and shared target genes of different ETS rearrangements*. *Neoplasia*, 2012. **14**(7): p. 600-11.
51. Molina-Pinelo, S., et al., *MicroRNA-dependent regulation of transcription in non-small cell lung cancer*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e90524.
52. Okada, N., et al., *Identification of TMEM45B as a protein clearly showing thermal aggregation in SDS-PAGE gels and dissection of its amino acid sequence responsible for this aggregation*. *Protein Expr Purif*, 2011. **77**(1): p. 118-23.
53. Minner, F., F. Herphelin, and Y. Poumay, *Study of epidermal differentiation in human keratinocytes cultured in autocrine conditions*. *Methods Mol Biol*, 2010. **585**: p. 71-82.
54. Frankart, A., et al., *Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface*. *Exp Dermatol*, 2012. **21**(11): p. 871-5.
55. Jans, R., *Eude du rôle des lysosomes et du cholestérol au cours de la différenciation des kératinocytes épidermiques*, in URPhyM, Faculté de Médecine. Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix.
56. *GeneCards*. 13 décembre 2015]; Available from: <http://www.genecards.org/>.
57. Geron, N. and H. Meiri, *The fusogenic substance dimethyl sulfoxide enhances exocytosis in motor nerve endings*. *Biochim Biophys Acta*, 1985. **819**(2): p. 258-62.
58. Dixon, C.J., et al., *Regulation of epidermal homeostasis through P2Y2 receptors*. *Br J Pharmacol*, 1999. **127**(7): p. 1680-6.
59. Adeva, M., et al., *Enzymes involved in l-lactate metabolism in humans*. *Mitochondrion*, 2013. **13**(6): p. 615-29.
60. Augoff, K., A. Hryniewicz-Jankowska, and R. Tabola, *Lactate dehydrogenase 5: an old friend and a new hope in the war on cancer*. *Cancer Lett*, 2015. **358**(1): p. 1-7.
61. Le, T.A., et al., *Flagellin induces the expression of thymic stromal lymphopoietin in human keratinocytes via toll-like receptor 5*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2011. **155**(1): p. 31-7.
62. Chadebech, P., et al., *Use of human reconstructed epidermis to analyze the regulation of beta-defensin hBD-1, hBD-2, and hBD-3 expression in response to LPS*. *Cell Biol Toxicol*, 2003. **19**(5): p. 313-24.
63. Ansel, J.C., et al., *The expression and modulation of IL-1 alpha in murine keratinocytes*. *J Immunol*, 1988. **140**(7): p. 2274-8.
64. Hayez, A., *Caractérisation de l'expression du gène TMEM45A dans les kératinocytes humains épidermiques normaux*, in Facultés des sciences. 2011, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix.
65. *ProteinAtlas*. 17 décembre 2015]; Available from: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000151715-TMEM45B/tissue>.
66. *Novusbio*. 1er décembre 2015]; Available from: http://www.novusbio.com/TMEM45B-Antibody_NBP1-88686.html.